**REGENERAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS
ADULTOS APÓS A INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DE
SCHWANN EM PRESENÇA DO FATOR NEUROTROFICO
DERIVADO DE CÉLULAS GLIAIS (GDNF). ANÁLISE
COMPORTAMENTAL E CELULAR**

Ricardo José de Almeida Leme

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
doutor em Ciências (Anatomia).**

**SÃO PAULO
2004**

**REGENERAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS
ADULTOS APÓS A INOCULAÇÃO DE CÉLULAS DE
SCHWANN EM PRESENÇA DO FATOR NEUROTROFICO
DERIVADO DE CÉLULAS GLIAIS (GDNF). ANÁLISE
COMPORTAMENTAL E CELULAR**

Ricardo José de Almeida Leme

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título
de doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Anatomia
Funcional: Estrutura e Ultra-Estrutura**

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

**SÃO PAULO
2004**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Leme, Ricardo José de Almeida.

Regeneração da medula espinhal de ratos adultos após inoculação de células de Schwann em presença do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF). Análise comportamental e celular / Ricardo José de Almeida Leme. -- São Paulo, 2004.

Orientador: Gerson Chadi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Anatomia. Área de concentração: Anatomia Funcional: Estrutura e Ultra-Estrutura. Linha de pesquisa: Neuroregeneração.

Versão do título para o inglês: Spinal cord regeneration in adult rats after Schwann cells inoculation in the presence of glial derived neurotrophic factor (GDNF). Behavioral and cellular analyses.

Descritores: 1. Células de Schwann 2. Medula espinhal 3. Fator neurotrófico GDNF 4. Neurotransmissor 5. Análise comportamental 6. Neuroplasticidade I. Chadi, Gerson II. Título.

ICB/SBIB048/2004

Candidato(a): Ricardo José de Almeida Leme.

Título da Tese: Regeneração da medula espinhal de ratos adultos após inoculação de células de Schwann em presença do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF). análise comportamental e celular

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 09/06/04, considerou o(a) candidato(a):

(☒) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a)

2) Examinador(a)

3) Examinador(a)

4) Examinador(a)

5) Presidente

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

FAPESP (99/01308-0) para R.J.A.L.

DEDICATÓRIA

Aos meus diamantes de ouro:

Professor pai José de Almeida Leme

Professora mãe Helena Strama de Almeida Leme

Professor irmão Fernando de Almeida Leme

Professora irmã Maria Inez de Almeida Leme

Professora avó Ignez Faedo Strama

Professor avô Francisco Strama (Mestre e incentivador *in memoriam*)

Professora de piano e do meu coração Juliana Duarte Carvalho

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Gerson Chadi, pela oportunidade, amizade, atenção, dedicação, orientação, confiança e presença constantes, meus sinceros e profundos agradecimentos. Agradeço de maneira especial pela paciência que o senhor teve em todos os momentos com minha pessoa e com minhas dificuldades e limitações, mas principalmente por enxergar e me dirigir nos momentos e nos lugares em que minha visão e humildade não foram suficientes.

À Professora Doutora Mary Bartlet Bunge, pela atenção e oportunidade de ter me permitido estagiar em seu laboratório onde aprendi bastante sobre a técnica de cultivo de células de Schwann, um dos pilares na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Martin Oudega, pela ajuda, orientação e conselhos sempre que as células não obedeciam aos protocolos, além da amizade e sabedoria compartilhadas.

À Professora Doutora Eugênia Costanzi Strauss pela valorosa contribuição nas discussões durante a padronização dos procedimentos no laboratório de cultura de células.

Ao Doutor José Jorge Machado, pela confiança, carinho, ética e incentivo constantes que sempre chegaram nas horas mais necessárias.

Ao Doutor Edson Bor Seng Shu, pelo exemplo, por existir, pelo jogo de corpo e por ter me dado a honra e o prazer de compartilhar um pouco da vida ao seu lado.

Ao Doutor Brenno Andrade e à Doutora Renata Andrade, pelo suave despertar e presença constante na forma de inspiração, sem o que não se vive.

Aos amigos do Laboratório de Neuroregeneração do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Vânia Gomide, Gilcélio Amaral, Michele Ramos, Alessandra Commodaro, Kátia Kietzer, Emerson Martins, Tereza Silva, Juliana

Pedroso, Tatiana Oliveira, Fausto Guzen, Vivian Silva, Milena Bochi, Fernanda Hussein, Patrícia Campos pelo trabalho em equipe e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela atenção e presteza constantes.

Aos animais que emprestaram seus corpos, emoções, percepções e existência para a realização dos experimentos que culminaram neste trabalho, minhas máximas reverências.

Agradeço finalmente e confesso aqui minha dificuldade em catalogar os nomes de todos aqueles aos quais sou grato, estejam eles entre nós ou em alguma outra dimensão que no momento atual a todos não se faz compreensível. Desta forma, amalgamo em Deus tudo e todos aqueles com os quais interagi nesta existência e, manifesto a mais profunda gratidão por ter podido aprender e compartilhar um pouco da vida com todos vocês durante o período da realização deste trabalho.

“Vocatus atque non vocatus, Deus aderit”

“Ora et labora”

O caminho mais próximo de Deus é pela porta do amor:

O caminho da ciência te conduz lentamente.

Ângelus Silesius (Andarilho querubim)

RESUMO

As células de Schwann (CS) são células da glia do sistema nervoso periférico que são usadas no reparo experimental de lesões do sistema nervoso central (SNC). CS foram cultivadas a partir de fragmentos de nervo ciático de ratos. Ratos Wistar adultos foram submetidos a transecção total da medula espinhal no 11º segmento torácico (T11) e tratados com enxertos locais de fibrina, fibrina e CS sem o fator de crescimento derivado das células da glia (GDNF) e fibrina e CS com GDNF, sendo submetidos a análises do comportamento motor do 1º ao 3º mês pós-operatório e do crescimento de fibras nervosas imunorreativas no epicentro do enxerto ao término deste período. No 3º mês, os testes BBB e plano inclinado (PI) foram aplicados. Estas análises mostraram uma melhora temporal dos parâmetros motores que foi superior nos grupos que receberam CS, sendo a performance potencializada pelo GDNF. No terceiro mês, os testes BBB e PI mostraram maiores índices nos grupos que receberam CS, sendo porém, ainda maiores na presença do GDNF. Imunomarcações para o neurofilamento (NF-200), proteína associada ao crescimento-43 (GAP-43), proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2), substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), na região do epicentro dos enxertos mostraram aumento na quantidade de axônios nos grupos que receberam CS, sendo o número delas maior na presença do GDNF. Ainda, a marcação de fibras serotoninérgicas descendentes mostrou que as fibras regeneradas apresentam dificuldade para reentrar no tecido medular. Maior número de fibras de neurônios da medula espinhal lombar foi encontrado nos grupos tratados com células, particularmente em associação com o GDNF. Em outra série de experimentos, a medula espinhal dos animais foi parcialmente transectada e a presença de astrócitos e microglia reativos (imunoistoquímica da GFAP e OX42, respectivamente) bem como do fator neurotrófico bFGF astrocitário foi avaliada em vários segmentos medulares craniais e caudais à lesão 1 semana e 3 meses após a cirurgia.

Ativação astrocitária e microglial bem como maior intensidade do bFGF astrocitário nas substâncias branca e cinzenta foi encontrada em toda a extensão da medula cranial e caudal ao local da lesão, o que está relacionado ao processo local de cicatrização e fenômenos tróficos/plásticos à distância.

O crescimento de fibras nervosas foi evidenciado no interior do enxerto de CS e potenciado pelo GDNF. A melhora comportamental observada pode estar relacionada às respostas plásticas medulares. Os achados indicam que as CS em associação com o GDNF constituem uma possibilidade terapêutica importante a ser considerada no tratamento da lesão medular.

ABSTRACT

Schwann cells (SC) are glial cells of the peripheral nervous system that have been used in the experimental repair of central nervous system (CNS) lesions. Primary SC cultures were obtained from rat sciatic nerve. Adult Wistar rats were submitted to a complete spinal cord transection at 11th thoracic segment (T11) and treated with local grafts of fibrin, fibrin plus SC without glial derived neurotrophic factor (GDNF) and fibrin plus SC plus GDNF, having been submitted to analysis of motor behavior from the 1st to the 3rd post operative month and of the immunoreactive fiber outgrowth in the graft epicenter at the end of this period. On the 3rd month, the BBB and inclined plane (IP) tests were applied. These analyses showed temporal improvements on motor parameters that were superior in the groups that received SC, being even higher in the presence of GDNF. On the third month, the BBB and IP tests showed higher indexes and inclined plane inclination in the SC groups, being even higher in the presence of GDNF. Immunostaining for neurofilament (NF-200), growth associated protein (GAP-43), microtubule associated protein (MAP-2), substance P and calcitonin gene related protein (CGRP), at the graft epicenter showed an increased amount of axonal fibers in the groups treated with SC, being even higher in the presence of GDNF. Still, the staining of serotonergic descendent fibers showed that regenerated fibers hardly reenter the spinal cord tissue. A higher amount of neuronal fibers in the spinal cord was found in the cell treated groups, particularly in association with GDNF. In another series of experiments, the spinal cords of the animals were partially transected and the presence of reactive astrocytes and microglia (immunohistochemistry of GFAP and OX42, respectively) as well as the astrocytic neurotrophic factor bFGF were analyzed in various cranial and caudal spinal cord segments to the lesion 1 week and 3 months after surgery. Astrocytic and microglial

activation as well as a higher intensity of astrocytic bFGF in the white and gray matters were found in the entire spinal cord, cranial and caudal to the lesion site, what is related to the local scar formation and distant trophic/plastic phenomena.

Axonal fiber outgrowth was shown inside the graft and potentiated by GDNF. The behavioral improvement observed can be related to spinal cord plastic responses. These findings indicate that SC in association with GDNF constitutes an important therapeutic approach to be considered in the treatment of spinal cord lesion.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	
1.1. – Regeneração no sistema nervoso central	16
1.2. – Modelos experimentais de lesão medular no estudo da regeneração do SNC	18
1.3. – Células de Schwann na regeneração do SNC	20
1.4. – Fator de crescimento derivado das células gliais (GDNF)	24
1.5. – Plasticidade na medula espinhal e a recuperação sensório-motora	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. – Análise da Regeneração da Medula Espinhal Totalmente transectada	31
3.1.1. – Cultura de Células de Schwann	31
3.1.2. – Procedimento Cirúrgico	36
3.1.3. – Montagem do Tubo com Células de Schwann e GDNF	37
3.1.4. – Análise Comportamental	38
3.1.5. – Processamento Tecidual	40
3.1.6. – Marcação Imunoistoquímica	40
3.1.7. – Análise Quantitativa Estereológica	42
3.1.8. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica	43
3.1.9. – Análise Qualitativa	43
3.1.10. – Análise Estatística	44
3.2. – Análise da Ativação Glial na Medula Parcialmente Transectada	44
3.2.1. – Procedimento Cirúrgico de Hemiseção Medular	44
3.2.2. – Processamento Tecidual	46
3.2.3. – Marcação Imunoistoquímica	46
3.2.3.1. – OX42 e GFAP	46
3.2.3.2. – Marcação Fluorescente Dupla para a GFAP e o bFGF	47
3.2.4. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica	47
3.2.5. – Análise Estatística	48
4. RESULTADOS	
4.1. – Enxerto de Células de Schwann na Medula Totalmente Transectada	51

4.1.1. – Cultura de células de Schwann	51
4.1.2. – Análise Comportamental Computadorizada	51
4.1.3. – Análise Comportamental Dependente do Observador	55
4.1.3.1. – BBB	55
4.1.3.2. – Teste do Plano Inclinado	55
4.1.4. – Análise Estereológica Quantitativa no Epicentro do Enxerto	57
4.1.4.1. – Neurofilamento	57
4.1.4.2. – GAP-43	62
4.1.4.3. – MAP-2	65
4.1.4.4. – Substância P	68
4.1.4.5. – CGRP	73
4.1.5. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica da Imunorreatividade da MAP-2 na Medula Espinhal Caudal ao Enxerto	75
4.1.6. – Análise Qualitativa da Imunorreatividade da 5-HT	78
4.2. – Análise da Ativação Glial na Medula Parcialmente Transectada	79
4.2.1. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica	79
4.2.1.1. – Análise da Imunorreatividade do OX42	79
4.2.1.2. – Análise da Imunorreatividade da GFAP	84
4.2.1.3. – Análise da Marcação Dupla Fluorescente para Detecção Simultânea de bFGF e GFAP	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. – Regeneração no sistema nervoso central

Era clássico o conceito de que uma vez lesado, o sistema nervoso central (SNC) não possuiria ferramentas para se recompor. Foi na virada do século passado que os neurofisiologistas ousaram especular sobre a capacidade regenerativa do SNC, ainda que limitada. Em 1906, os vencedores do prêmio Nobel em Fisiologia/Medicina, Camilo Golgi e Santiago Ramón y Cajal já se preocupavam com o contraste entre as capacidades regenerativas dos sistemas nervosos periférico (SNP) e central. Cajal realizou experimentos onde encontrou pouca resposta regenerativa, e em alguns casos ausente, após a transecção de axônios do SNC (RAMON Y CAJAL, 1914 *apud* STAHNISCH & NITSCH, 2002). Assim ele já postulava que a capacidade regenerativa dos neurônios depende muito do seu microambiente, sendo este um dos principais fatores de diferenciação entre as capacidades regenerativas do SNC e SNP (ZAGER *et al.*, 1988).

O conceito da regeneração limitada dos neurônios no SNC permaneceu até os anos 80, quando Aguayo demonstrou capacidade regenerativa considerável dos neurônios centrais desde que condições apropriadas fossem fornecidas para que o processo de crescimento axonal, uma vez iniciado, pudesse continuar (AGUAYO *et al.*, 1981). Em um de seus experimentos, Aguayo enxertou um segmento de nervo ciático entre as duas extremidades da medula espinhal do rato completamente seccionada. Decorridas algumas semanas, o autor demonstrou no interior da ponte de nervo, a presença de axônios pertencentes a neurônios localizados proximal e distalmente ao local da lesão.

Hoje está claro que os neurônios do SNC têm uma capacidade regenerativa intrínseca, embora raramente isto ocorra de forma plena. A falência regenerativa dos neurônios do SNC é atribuída em parte à intensa reação celular local, na qual os astrócitos se tornam reativos e proliferam, a microglia e os precursores dos oligodendrócitos se multiplicam e migram, e a bainha de mielina se fragmenta lançando moléculas que restringem o crescimento de fibras nervosas (FAWCETT & ASHER, 1999; KOSHINAGA & WHITTEMORE 1995).

Apesar dos astrócitos agirem como agentes promotores ao crescimento axonal, alguns dias após a lesão eles passam a produzir uma variedade de proteoglicanos inibitórios (FAWCETT, 1997).

A microglia por sua vez também apresenta um comportamento dual já que suas células promovem o crescimento axonal e, no entanto, podem ser estimuladas a produzir toxinas que sabidamente são tóxicas aos neurônios e axônios (RABCHEVSKY & STREIT, 1997).

Os oligodendrócitos na sua forma madura possuem duas moléculas com características inibitórias ao crescimento axonal, a proteína NOGO (NI250) e a glicoproteína associada à mielina (MAG) (SCHWAB *et al.*, 1993; MUKHOPADHYAY *et al.*, 1994), enquanto que os precursores destas células produzem um proteoglicano da família do coindritin sulfato, o NG2, que sabidamente tem efeitos inibitórios ao crescimento neurítico (DOU & LEVINE 1997).

Deste modo, a reação glial após uma lesão do SNC apresenta comportamento dual, participando de forma inibitória ao crescimento de fibras nervosas, em se tratando da formação da cicatriz glial nas bordas da lesão, e por outro lado estimulando o crescimento

delas, levando-se em conta a expressão de fatores neurotróficos gliais em regiões próximas e distantes do local da lesão (LEME & CHADI 2001).

Atualmente existem inúmeros trabalhos avaliando os processos regenerativos dos neurônios do SNC após lesões medulares (XU *et al.*, 1997, ROSENBLUTH *et al.*, 1997; YOUNG 1996; BREGMAN *et al.*, 1997; GUEST *et al.*, 1997; DIENER *et al.*, 1998; NOVIKOVA *et al.*, 1997; GRILL *et al.*, 1997). O uso de transplantes de pontes de nervos periféricos, de suspensão de células de Schwann, de populações celulares de origem fetal e de células gliais centrais cultivadas associadas ou não à infusão de fatores neurotróficos são as abordagens mais utilizadas nestes estudos (XU *et al.*, 1997, ROSENBLUTH *et al.*, 1997, MENEI *et al.*, 1998, BREGMAN *et al.*, 1997, GUEST *et al.*, 1997, OORSCHOT *et al.*, 1998, DIENER *et al.*, 1998a, 1998b).

1.2. – Modelos experimentais de lesão medular no estudo da regeneração do SNC

Diversos modelos experimentais são empregados no estudo da regeneração do SNC após o traumatismo medular (RAMER *et al.*, 2000). Mesmo os mais comumente empregados apresentam vantagens e desvantagens, entretanto são utilizados para responder questões específicas relativas à terapia a ser analisada, bem como os fenômenos envolvidos na neurodegeneração e na promoção ou restrição à neuroregeneração. Basicamente os modelos dividem-se naqueles em que se utilizam as transecções medulares, parciais ou completas, e nas contusões medulares, seja por queda de pêndulos ou compressões prolongadas (KWON *et al.*, 2002; MULTON *et al.*, 2003).

Modelos de transecção constituem a melhor alternativa para a análise da regeneração de tratos axonais específicos, enquanto os modelos de contusão, nos quais tratos axonais podem ser preservados após a lesão, são comumente utilizados no estudo de mecanismos de neuroproteção (KWON *et al.*, 2002). Métodos experimentais adicionais, como aqueles que promovem a desmielinização, bem como a neurotoxicidade e isquemia, são também largamente utilizados para fins específicos (YU *et al.*, 1999; GRAÇA *et al.*, 2001).

Os estudos anatômicos empregam técnicas histológicas e se baseiam no uso de marcadores histoquímicos, imunoistoquímicos e de traçadores neuronais (CHADI *et al.*, 2001; TAKAMI *et al.*, 2002). Ainda, impregnações metálicas pelo ouro e pela prata foram longamente utilizadas para a marcação do neurópilo medular. As técnicas de imunoistoquímica utilizam anticorpos contra proteínas encontradas em populações celulares específicas, permitindo que estas possam ser vistas em secções histológicas da medula espinhal (LEME & CHADI 2001). Outra forma de se acessar a anatomia do processo regenerativo é através do uso de traçadores axonais, moléculas que podem ser absorvidas por neurônios ou axônios e transportados de forma anterógrada ou retrógrada nestas células (TAKAMI *et al.*, 2002).

Os testes neurofisiológicos também constituem uma alternativa para a avaliação de intervenções experimentais em modelos animais, sendo em geral usados para determinar a eficácia de agentes neuroprotetores aplicados após a lesão medular (GAVIRIA *et al.*, 2000).

A recuperação funcional é o objetivo final de toda abordagem experimental envolvendo análise da regeneração da medula espinhal, sendo que inúmeras técnicas de avaliação da recuperação motora e comportamental são desenvolvidas neste sentido

(BASSO *et al.*, 1996; CHADI *et al.*, 2001). É importante notar que a interpretação dos testes funcionais é limitada pela dificuldade em se estabelecer os fatores anatômicos responsáveis pela recuperação sensitiva e motora.

Desta forma, estudo mais completo será aquele feito pela associação de técnicas que abrangem desde a análise comportamental à análise tecidual, e a identidade química das fibras regeneradas como a proposta neste estudo.

1.3. – Células de Schwann na regeneração do SNC

O implante de enxertos de células de Schwann obtidas a partir de nervos e expandidas *in vitro* é proposto como uma possibilidade terapêutica futura para o reparo de lesões do SNC e SNP em humanos (CASELLA *et al.*, 1996).

Uma vez que no SNC do adulto os axônios lesados não se regeneram espontaneamente através de suas vias originais para atingir seus órgãos alvo (RAISMAN, 1997), modelos experimentais utilizando pontes de nervos foram desenvolvidos na tentativa de contornar esta incapacidade (CHENG *et al.*, 1996). Descreve-se que o efeito destes enxertos de nervos se deve à presença de células de Schwann vivas no seu interior (SMITH & STEVENSON, 1988).

Apesar dos enxertos de nervos induzirem o crescimento e o alongamento dos axônios centrais cortados no seu interior, o mesmo não ocorre em relação à saída dos axônios e seu retorno ao SNC. Particularmente no que diz respeito à medula espinhal, a cicatriz glial que se forma no local da lesão medular bem como o microambiente alterado que se origina desta lesão são considerados os principais fatores relacionados a esta falência regenerativa (MCKEON *et al.*, 1991).

O transplante de populações purificadas de células de Schwann parece ser uma alternativa viável na tentativa de contornar estes fatores restritivos, relacionados ao microambiente regenerativo, ao crescimento de fibras nervosas (XU *et al.*, 1997). As células de Schwann secretam fatores neurotróficos, expressam moléculas de adesão e produzem numerosas moléculas da matriz extracelular, que sabidamente influenciam o crescimento das fibras nervosas (HÖKE *et al.*, 2003; XU *et al.*, 1997). Além disso, a injeção local de células de Schwann está relacionada à diminuição da cicatriz glial (MARTIN *et al.*, 1996). Por fim, outra vantagem do uso dessas células deve-se a características técnicas, já que, o seu número pode ser rapidamente aumentado *in vitro* em um curto período de tempo (MORRISSEY *et al.*, 1991).

A combinação de fatores neurotróficos com enxertos de nervos ou populações purificadas de células de Schwann constitui outra possibilidade para contornar as barreiras ao processo de regeneração neural no SNC (CHENG *et al.*, 1996)

Até o presente momento, a recuperação de lesões do SNC é dificultada pelas capacidades limitadas de regeneração das células nervosas perdidas, de remielinização de fibras e de restabelecimento de conexões neurais funcionais. Nas lesões do SNC, como a esclerose múltipla, os acidentes vasculares cerebrais e medulares e o traumatismo, a desmielinização de neurônios intactos é um fator importante que contribui para a perda de função, havendo estudos que demonstraram que a remielinização dos neurônios sobreviventes pode ocasionar recuperação funcional significativa (WAXMAN *et al.*, 1994).

O transplante de suspensões de células de Schwann foi realizado com sucesso no reparo de algumas vias do parênquima cerebral (KROMER *et al.*, 1985; MONTERO-MENEI *et al.*, 1992; STICHEL *et al.*, 1996), sugerindo a importância da remielinização no

processo regenerativo das fibras centrais, no que diz respeito à melhora da condução nervosa nos axônios regenerados (LIU *et al.*, 2000).

A capacidade das células de Schwann de induzir a ramificação e a extensão dos brotamentos axonais do SNC constitui outra característica do seu potencial como promotor da regeneração neural (PENG *et al.*, 2003).

A acessibilidade das células de Schwann em estágio de cultura, antes do transplante delas no tecido nervoso, oferece, ainda, uma oportunidade prática para o estudo dos efeitos da sua manipulação na análise das melhores condições para sua promoção da regeneração do SNC e que torna otimista a sua utilização no reparo da lesão medular em seres humanos (RAISMAN, 1997). Vários estudos investigam a capacidade das células de Schwann em favorecer o crescimento de fibras e sua reentrada no SNC (XU *et al.*, 1997; LI & RAISMAN, 1994). No entanto, para que ocorra uma regeneração efetiva, os axônios em regeneração devem passar através dos transplantes, retornar ao SNC e se conectar de forma apropriada nos inúmeros destinos possíveis. Deste modo, a efetividade das pontes de células de Schwann vai depender da capacidade de auto-organização do SNC adulto (FLORENCE *et al.*, 1995).

Existem vários métodos descritos para o estabelecimento de culturas de células de Schwann (MENEI *et al.*, 1998; LEVI, 1996; LI *et al.*, 1996; JIRSOVÁ *et al.*, 1997; WEISS *et al.*, 1996; MORRISSEY *et al.*, 1991). Os fibroblastos são os maiores contaminantes destas culturas, havendo vários métodos descritos para reduzir a população destas células (LI *et al.*, 1996, JIRSOVÁ *et al.*, 1997).

Quando implantadas em associação a enxertos de nervos após a lesão medular, as células de Schwann levam a uma melhor integração do nervo enxertado (WRATHALL *et al.*, 1982), e também diminuem a cavitação e a gliose reativa do local (MARTIN *et al.*,

1993) mas sem o reparo completo das vias medulares lesadas. Quando existem espaços teciduais dentro da medula espinhal, substratos de regeneração são necessários, numa forma tal que propiciem contatos físicos estáveis entre as regiões de parênquima lesado (GUEST *et al.*, 1997). As células de Schwann podem ser implantadas no SNC como componente de um enxerto de nervo periférico, como uma suspensão de células purificadas, ou como uma população celular no interior de um canal de polímero biocompatível (MENEI *et al.*, 1998).

Os transplantes nervosos periféricos têm limitações inerentes, uma vez que suas características celular, molecular e física são pré-definidas (GUEST *et al.*, 1997). A criação de ambientes controlados de regeneração, que incorporem os substratos regenerativos lá deixados, é fator importante para o tratamento da lesão medular. Isto permitiria a combinação de células em cultura com materiais sintéticos e biológicos, de forma que os constituintes seriam bem definidos, e o ambiente no qual ocorre a regeneração poderia até certo ponto ser controlado. Tais implantes poderiam ser construídos para se otimizar o uso de terapias adjuvantes, como a liberação de neurotrofinas (XU *et al.*, 1997) ou a colocação de células modificadas geneticamente com capacidade de produção de substratos estimuladores da regeneração (TUSZYNSKI *et al.*, 1994; MENEI *et al.*, 1998).

Um tipo de microambiente controlado propício à regeneração pode ser aquele constituído, por exemplo, por um canal de polímero quando semeado com uma população celular definida (FRIEDMAN *et al.*, 2002). Estes canais são biocompatíveis, oferecem força tênsil substancial devido à sua parede externa trabeculada, reduzem a invasão de células mesenquimais no transplante, e ainda, limitam as trocas moleculares entre o enxerto e o ambiente externo devido à sua membrana interna com permeabilidade seletiva

(AEBISCHER *et al.*, 1991). A introdução de células de Schwann neste canal segue-se de um processo de contração chamado sinérese em que as células de Schwann alinham-se em um cabo sólido ao longo do eixo maior do canal (GUÉNARD *et al.*, 1992).

Descreve-se, no entanto, que estes canais podem exercer alguns efeitos indesejáveis no SNC, relacionados ao inchaço que se segue à transecção da medula espinhal, podendo ocorrer isquemia pela compressão promovida pela circunferência do canal sobre as bordas do tecido medular remanescente (FRIEDMAN *et al.*, 2002; GUEST *et al.*, 1997). Além disto, o polímero é mais rígido que o parênquima medular, e a movimentação pode resultar em repetidos microtraumas na interface entre o canal e a medula. Isto pode levar a aumento na gliose, inflamação, cavitação, e mesmo quebra na junção transplante/receptor. Ainda, as características de difusão dos canais podem limitar o metabolismo celular no interior do enxerto, ao menos até que a vascularização seja restabelecida (GUEST *et al.*, 1997).

Estes efeitos adversos levaram GUEST *et al.* (1997) a considerar o canal de PAN/PVC apenas para a formação do cabo organizado de células de Schwann, removendo o mesmo para a realização do implante. Esta estratégia permitiria a formação inicial do enxerto, mas não permitiria o controle do microambiente da regeneração.

1.4. – Fator de crescimento derivado das células gliais (GDNF)

Na questão das interações tróficas que determinariam o melhor microambiente à regeneração, uma nova fase se iniciou com a descoberta do fator de crescimento do nervo (NGF) em 1954 por Rita Levi Montalcini e dos demais fatores neurotróficos a posteriori (GURGO *et al.*, 2002; HAMBURGER, 1980).

O fator de crescimento derivado de células gliais (GDNF) é um membro da família do fator de crescimento transformado beta (TGF β), apresentando efeito trófico potente aos neurônios dopaminérgicos adultos ou em desenvolvimento, aos neurônios motores (SAARMA & SARIOLA, 1999; LIN *et al.*, 1993) e às subpopulações de neurônios sensitivos e autonômicos (BUJ-BELLO *et al.*, 1995). Além disso, o GDNF é retrogradamente transportado por neurônios sensitivos e motores, tendo sua expressão aumentada nas células de Schwann do nervo ciático após lesão (HÖKE *et al.*, 2002)

IGARASHI *et al.* (1999) demonstraram a existência de receptores GFR α 1 para o GDNF em toda a estrutura celular dos capilares da barreira hematoencefálica, sugerindo assim seu papel no processo de reparo do tecido nervoso lesado.

Vários trabalhos demonstram as respostas relacionadas à proteção e à regeneração dos neurônios centrais por ação de fatores neurotróficos (ANDERSON *et al.*, 1988; GÓMEZ-PINILLA *et al.*, 1992). O fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), os fatores de crescimento de fibroblastos, frações ácida (aFGF) e básica (bFGF) e o GDNF são alguns dos diversos fatores produzidos pelas células do SNC (ELDE *et al.*, 1991; MATSUYAMA *et al.*, 1992). A síntese deles aumenta após a lesão do tecido nervoso (FRAUTSCHY *et al.*, 1991; SATAKE *et al.*, 2000) e sua administração exógena restringe a morte neuronal decorrente da lesão (CHADI *et al.*, 1993a). Além disso, estes fatores estimulam o crescimento axonal de neurônios centrais, *in vivo* e *in vitro* (BLESCH & TUSZYNSKI, 2001). A administração deles próximo ao local da lesão, no SNP, potencia o crescimento de fibras (HEUMANN *et al.*, 1987; KANJE *et al.*, 1989). Existem relatos em que se atribui ao GDNF uma potência 75 vezes maior que outros fatores neurotróficos na sobrevivência de motoneurônios de ratos em meios de cultura (HENDERSON *et al.*, 1994).

Aparentemente é o fator com maior eficácia em impedir a atrofia de motoneurônios submetidos à axotomia (HENDERSON *et al.*, 1994).

1.5. – Plasticidade na Medula Espinhal e a Recuperação Sensório-Motora

Marcadamente poucos axônios remanescentes são necessários para o animal lesado recuperar alguma função motora, tendo sido descrito que o restabelecimento de apenas 10% da população axonal foi suficiente para a recuperação da locomoção em gatos e ratos (YOUNG, 1996). A explicação para isto se baseia no fato de que a locomoção consiste num movimento rítmico gerado por circuitos locais intrinsecamente ativados na medula espinhal e que são denominados de centros geradores de padrão de marcha (CPG). Estes centros são modulados por impulsos supraespinhais, segmentares e intersegmentares (MURRAY, 1997). Sendo assim, após a lesão medular, atividades que envolvem movimentos padronizados, como a locomoção, podem não ser afetadas tão intensamente como aquelas que não são iniciadas por geradores de padrões (DIENER *et al.*, 1998a).

Apesar de no momento presente não existirem estudos demonstrando se as conexões axonais após a lesão do SNC são aleatórias ou precisas, vários experimentos demonstram melhoras funcionais variáveis, dependendo do tipo de manipulação efetuada (BREGMAN, 1998). O número de axônios regenerados nos modelos descritos até o presente momento é pequeno, no entanto o efeito funcional observado nos diferentes estudos é um achado estimulante no sentido de se alcançar resultados cada vez melhores (FAWCETT, 1998).

Os motoneurônios adultos interagem com muito mais células do tecido nervoso que os motoneurônios imaturos. A consequência disto para o suporte trófico dos

motoneurônios é desconhecida, embora evidências sugiram que os motoneurônios maduros recebam suporte trófico de vários tipos celulares, incluindo fibras musculares esqueléticas, células de Schwann, neurônios e células gliais (OORSCHOT *et al.*, 1998).

A medula espinhal caudal à transecção apresenta uma plasticidade considerável, sendo que a função dela quando isolada pode ser modificada por treinamento (EDGERTON *et al.*, 1997) ou por fármacos (GIROUX *et al.*, 2003). Otimizar a função da medula espinhal abaixo do local lesado seja pelo restabelecimento de conexões supraespinhais, pela reabilitação ou pelo uso de substâncias específicas consiste assim em uma importante área de pesquisa. Finalmente, a combinação dos efeitos envolvendo a regeneração de fibras no local do trauma e a plasticidade neuronal no tecido nervoso não lesado pode efetivamente trazer vantagens no que diz respeito à recuperação funcional.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1 - Analisar nos animais com transecção total da medula espinhal ao nível do 11º segmento torácico e tratados com enxerto de fibrina ou de células de Schwann na presença ou não do GDNF:

1a – A evolução dos parâmetros motores em campo aberto utilizando métodos de análise comportamental dependentes ou não do observador e o teste do plano inclinado nos primeiros 3 meses após a cirurgia.

1b – A quantidade de fibras imunorreativas ao neurofilamento, à proteína associada ao crescimento-43 (GAP-43), à proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2), à substância P e ao peptídeo associado ao gene da calcitonina (CGRP) no epicentro dos enxertos, 3 meses após a cirurgia.

1c – A presença de fibras imunorreativas à 5-hidroxitriptamina (5-HT) no epicentro do enxerto e nos segmentos lombares da medula espinhal transectada e tratada.

1d – Modificações da imunorreatividade da MAP-2 nos segmentos lombares da medula espinhal transectada e tratada.

2 – Analisar a magnitude da reação dos astrócitos e da microglia bem como da expressão do bFGF astrocitário em níveis da medula espinhal craniais e caudais à transecção parcial feita no quadrante dorsal direito do órgão espinhal 7 dias e 3 meses após a cirurgia.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS*

3.1. Análise da Regeneração da Medula Espinhal Totalmente Transectada

3.1.1. Cultura de Células de Schwann

Sob o fluxo laminar, placas para cultura, com tampa, de 100mm e de 60mm foram preparadas. Volumes de 30ml do meio Leibovitz-15 (L-15; Gibco, Grand Island, EUA) foram colocados nas placas de 100mm e 5ml de L15 nas placas de 60mm. A seguir, ratos Wistar adultos jovens (60 dias) foram anestesiados com éter, tendo sido tricotomizada a pele dos membros traseiros, sendo feita em seguida assepsia local com sabão, água e álcool 70%.

Os nervos ciáticos dos ratos foram retirados e colocados nas placas de 100mm com L15, sob técnica cirúrgica asséptica, segundo método descrito por MORRISSEY e colaboradores em 1991. Todo o excesso de tecido (músculo, gordura e vasos sanguíneos) aderido aos nervos foi removido sob magnificação por lupa estereoscópica microcirúrgica (DF Vasconcelos, Brasil). Os nervos limpos foram colocados em uma placa de 100mm com L15. A seguir, o perineuro dos nervos foi removido sob magnificação e técnica microcirúrgica, e, então, colocados em uma placa de 60mm com L15. Em seguida, os nervos foram cortados com uma microtesoura em pedaços de 1mm. Os fragmentos dos nervos foram colocados em placas de 60mm com 1,5ml de meio de cultura DMEM (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Hyclone, EUA) e gentamicina 0,1% (Life Technologies, EUA), meio este denominado de D10. O excesso de meio foi removido de

* Este estudo foi conduzido por protocolos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Processo nº 152/2002)

forma que os explantes não ficassem flutuando, mas se mantivessem cobertos completamente. Este procedimento leva à saída progressiva dos fibroblastos que vão deixando os explantes primários e se fixando à placa de cultura. O D10 destas culturas foi trocado 2 vezes por semana, sendo os explantes transferidos para uma placa nova com meio novo, aproximadamente 1 vez por semana, por 5 semanas. Esta transferência era feita sempre que se observava quantidade grande de fibroblastos migrando a partir do explante (Fig. 1).

Figura 1: Microfotografia por contraste de fase em microscópio invertido mostrando fibroblastos (setas finas) migrando do explante primário de nervo ciático do rato (seta grossa) em placa de cultura. Barra: 100µm.

Após cada procedimento, as placas com os explantes foram recolocadas na incubadora de CO₂, tendo sido elas mantidas em atmosfera de 6% de CO₂ e temperatura de 37,0°C.

A dissociação enzimática dos explantes era feita no momento em que a maioria das células que migravam dos explantes era de Schwann. A dissociação gerava no período de 12 horas uma população de células constituída ainda por fibroblastos, agora em menor número, e por células de Schwann. A dissociação enzimática consistiu em deixar os explantes pernovernarem em uma solução de dispase (1,25U/ml; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) e collagenase (0,05%; Worthington, Freehold, EUA), enzimas que agem sobre os explantes dissociando-os completamente. Na segunda etapa da dissociação enzimática a solução de dispase/collagenase foi removida por centrifugação e ressuspensão no D10. A seguir, as células foram semeadas em placas de 100mm contendo o meio D-10 acrescido dos mitógenos extrato pituitário bovino (20µg/ml; Biomedical Technologies, EUA) e forskolina (2µM; Sigma, EUA) (RAMÓN-CUETO *et al.*, 1998). No dia seguinte, as células mortas e os restos de mielina eram eliminados com a troca do meio. Esta etapa foi chamada de P₀ e o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. Neste momento, foi permitido que as duas populações de células crescessem em conjunto até a confluência e preenchimento de toda a extensão do fundo da placa de cultura.

Após a confluência ter sido atingida, iniciou-se a segunda fase de eliminação dos fibroblastos. A partir daí, sempre que era necessária a manipulação das células, procedia-se à tripsinização das placas. Este passo consiste na retirada do meio de cultura das placas e manutenção das mesmas por 3 minutos em uma solução de tripsina-EDTA (0,05% tripsina e 0,02% EDTA em HBSS; GIBCO). Este procedimento levava ao descolamento das células de Schwann aderidas às placas de cultura de modo que elas pudessem ser transferidas, centrifugadas, ressuspensas, tratadas com outras substâncias e, a seguir, replaqueadas.

Uma vez que as células eram colocadas em um tubo de ensaio e centrifugadas, iniciava-se a segunda fase que consistia no tratamento delas com o anticorpo Thy1.1 (gentilmente fornecido pelo Dr. Martin Oudega do Projeto Miami para a Cura da Paralisia, University of Miami, EUA), obtido a partir do sobrenadante do meio de cultura de uma linhagem de células de hibridoma. Brevemente, as células do hibridoma são cultivadas em meio DMEM. Durante sua multiplicação, sem que se acrescente qualquer substância ao meio, estas células secretam o anticorpo Thy 1.1 no meio de cultura. Então, o meio condicionado é retirado e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos para a retirada de células em suspensão, após o que, pode ser utilizado.

Para cada placa de cultura de 100mm foi acrescentado 1ml de Thy1.1 e as células foram ressuspensas sendo mantidas por 30 minutos sob agitação leve. A substância Thy1.1 se liga aos fibroblastos. A seguir, após centrifugação, retirou-se a primeira e adicionou-se uma segunda substância, o anticomplemento de coelho (ICN Pharmaceuticals, EUA) 1ml por placa. A conjugação destas duas substâncias levou à eliminação dos fibroblastos da cultura, tendo restado então uma população mais pura de células de Schwann que foi semeada em etapa chamada de P₁. O meio de cultura D10 acrescido de mitógenos foi trocado duas vezes por semana e as placas mantidas na incubadora de CO₂, nas condições descritas anteriormente. Assim que as células atingiam a confluência (Fig. 2) era realizada a divisão do total de células em duas novas placas passando a P₂ e posteriormente pelo mesmo processo a P₃, em intervalos semanais, passagem que as células foram utilizadas no enxerto. Foi utilizada esta idade de passagem das células, pois passagens mais tardias podem levar a alterações genotípicas das mesmas com conseqüentes alterações no seu fenótipo.

Após a adequação metodológica do procedimento foi obtida com sucesso uma população de $1,5 \times 10^8$ células de Schwann que foram utilizadas nos experimentos.

Figura 2: Microfotografias mostrando células de Schwann cultivadas a partir do nervo ciático do rato, plaqueadas e confluentes (setas) em conformação usual. Barras: 400 μ m (A), 100 μ m (B).

3.1.2. Procedimento Cirúrgico

Dividiu-se 30 ratos *Wistar* adultos machos, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com peso aproximado de 245g em 3 grupos: 10 animais com enxerto de tubos com fibrina sem células de Schwann, 10 animais com enxerto de tubos com fibrina e células de Schwann e 10 animais com enxerto de tubos com fibrina e células de Schwann com o fator neurotrófico GDNF. Os animais foram inicialmente sedados com halotano inalatório e a seguir anestesiados com 0,14ml/100g de Hypnol (3%, Cristália, Brasil).

Após tricotomia e assepsia local, fez-se uma incisão longitudinal sobre a região torácica baixa do dorso dos animais. A seguir, afastaram-se os planos musculares profundos e separaram-se os mesmos dos processos espinhosos das vértebras torácicas de níveis 11 e 12 (T11-12). Os processos espinhosos destas vértebras foram retirados expondo-se o segmento medular adjacente. Foi então realizada a secção medular por toda a extensão do seu eixo longitudinal em dois pontos, com a retirada de um segmento de aproximadamente 4mm de tecido nervoso. Nesta solução de continuidade, enxertos de fibrina (5%) apenas, de fibrina e células de Schwann sem o GDNF e de fibrina e células de Schwann com GDNF foram implantados em cada grupo de 10 animais conforme descrito a seguir (vide item 3.1.3.).

Finalizando, realizou-se o fechamento dos planos muscular e subcutâneo com fios de náilon e da pele com cliques metálicos. Os animais foram colocados em número de 5 por gaiola recebendo água de torneira e ração à vontade. Realizou-se o esvaziamento manual das bexigas diariamente até que os animais adquirissem novamente o controle vesical, que ocorreu em geral após 10 dias da cirurgia. Administrou-se 0,1ml/100g de gentamicina

(50mg/ml, Life Technologies, EUA) aos animais com sinais de infecção urinária (urina escura, fétida ou com sangue) até se observar melhora clínica deles.

3.1.3. Montagem do Tubo com Células de Schwann

Para a construção do enxerto de fibrina na concentração de 5%, foi utilizado fibrinogênio tipo I de plasma humano (Sigma F3879) diluído a 100mg/ml em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), gentamicina (10mg/ml) (GIBCO 15750-060), aprotinina de pulmão bovino (0,77IU/100µl) (Sigma A1153: 10mg com 48UI em 62µl DMEM), trombina de plasma bovino (25 unidades/µl) (Sigma T3399: 10000 unidades em 400µl DMEM) e cloreto de cálcio na concentração de 8%.

Na construção do enxerto de fibrina 5% com células de Schwann subtraiu-se o volume de DMEM correspondente ao volume total das células a serem acrescentadas ao enxerto. Em ambos os casos, com uma micropipeta, injetou-se o volume obtido no interior do tubo de poliacrilonitrilo/polivinilcloreto (PAN/PVC, diâmetro interno = 2,8mm) que serviu de molde para os enxertos (em cada centímetro de tubo tem-se aproximadamente 10 milhões de células). Este tubo foi mantido na incubadora de CO₂, nas condições descritas anteriormente, por 10 minutos e, a seguir, retirado e mantido em meio de cultura DMEM até o momento de sua utilização.

Para a inoculação do fator neurotrófico, embebeu-se o “gelfoam” em solução contendo o GDNF recombinante humano (hrGDNF) (Sigma G1777) conforme técnica previamente descrita (OTTO *et al.*, 1989; OTTO & UNSICKER, 1993) diluído em líquido cefalorraquidiano sintético. Um total de 10µg de GDNF foi diluído nesta solução, resultando em implantes uniformes de “gelfoam” embebidos em 1µg de GDNF.

No momento da colocação dos enxertos, o tubo de PAN/PVC foi retirado, tendo sido implantado nos animais apenas o seu conteúdo interno solidificado. O enxerto foi posicionado de modo a preencher completamente o espaço criado após a remoção do tecido medular, ficando em contato direto com ambos os cotos medulares.

3.1.4. Análise Comportamental

Após 1 semana das cirurgias, iniciou-se o registro do comportamento dos animais operados pela utilização do sistema automatizado de análise da atividade motora por emissão de feixe de luz infravermelho, (Coulbourn Instruments, EUA). Este sistema permitiu a análise rápida e simultânea de vários animais.

Os ratos foram colocados individualmente em caixas de polietileno (37x17x30cm), equipadas com um sensor de luz infravermelha na porção superior de sua parede. Os registros foram feitos por 30 minutos (tempo de observação), 2 vezes por semana por um período pós-operatório de 3 meses. A sala de experimentação teve sua iluminação interrompida e mantida sob condições constantes de temperatura e umidade (CHADI *et al.*, 1993a). Três parâmetros foram detectados e registrados de acordo com o tempo de ocorrência do movimento. O tempo sem movimento corresponde ao tempo no qual o animal não se moveu ou o fez por um tempo inferior a 0,01s durante o período da observação. O número sem movimentos refere-se ao número médio destes eventos registrados durante o tempo de observação. Os tempos de pequenos e grandes movimentos são definidos como movimentos contínuos de duração nos intervalos de tempos de 0,01 a 0,1s e maiores que 1,0 segundo, respectivamente. Os números de eventos de pequenos e grandes movimentos referem-se ao número médio de ocorrências de pequenos e grandes

movimentos durante o tempo de observação. Os dados foram transferidos para o computador e um programa específico de computador analisou os números. Os dados foram agrupados e as médias mensais foram apresentadas.

Em acréscimo, foi realizada a análise do comportamento motor utilizando-se o BBB e o teste do plano inclinado descrito por GALE *et al.* (1985). O índice do BBB foi desenvolvido por Basso, Beattie e Bresnahan (BASSO *et al.*, 1996) para ser utilizado na avaliação de padrões de recuperação da movimentação dos membros posteriores de ratos submetidos a lesões parciais da medula espinhal usando o NYU Impactor. Sua pontuação varia de 0 a 21 e divide-se em três momentos: de 0 a 7 corresponde aos movimentos das articulações dos membros posteriores nos estágios iniciais de recuperação, de 8 a 13 é feita avaliação dos passos e coordenação na fase intermediária de recuperação e, finalmente, de 14 a 21 corresponde à avaliação da movimentação fina das patas usadas durante a locomoção. Dois observadores, desconhecedores dos procedimentos a que os animais foram submetidos, realizaram as avaliações no terceiro mês do pós-operatório, duas vezes por semana até a data do sacrifício dos animais.

No teste do plano inclinado, os ratos foram colocados individualmente com a cabeça voltada para baixo em um plano inclinado emborrachado construído de acordo com o descrito por Rivlin e Tator (GALE *et al.*, 1985). O ângulo foi gradativamente aumentado de zero grau até o ponto em que o rato não podia mais se manter na posição inicial por 5 segundos. Ratos normais mantêm-se no plano com uma inclinação de 50 a 60 graus (RIVLIN & TATOR, 1977). Este teste foi realizado 2 vezes por semana no terceiro mês do pós-operatório dos animais.

3.1.5. *Processamento Tecidual*

Noventa dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados através de uma perfusão transcardíaca de solução salina (0,9%) e solução fixadora. A solução fixadora é uma solução modificada (ZAMBONI & DEMARTINO, 1967 *apud* GOMIDE & CHADI, 1999) e consiste de 4% paraformaldeído diluído em tampão fosfato (0,1M; Ph 7,4). Segmentos das medulas espinhais foram rapidamente removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora por 90 minutos e lavadas em uma solução de sacarose (10%) dissolvida em tampão fosfato por 48 horas. Os segmentos das medulas espinhais, contendo os enxertos, foram reduzidos a 2 cm, congelados com isopentano e gelo seco (-45°C) e cortes seriados transversais de 20 µm foram feitos. Os cortes de congelamento foram efetuados num criostato Leica, modelo CM3000 (Alemanha) com temperatura fixa em -20°C. Os cortes foram montados em lâminas congeladas e processados para a imunoistoquímica.

3.1.6. *Marcação Imunoistoquímica*

O método imunoistoquímico foi descrito com detalhes por CHADI *et al.* (1993a, 1994) e HUMPEL *et al.* (1994). Com um início aleatório, as secções das regiões estudadas foram amostradas sistematicamente, incluindo cada 80 secções. Dez séries, em ordem rostro-caudal, foram então obtidas. Estas séries foram submetidas à análise imunoistoquímica estereológica. Uma das séries de secções recebeu uma coloração pelo Violeta de Cresilo (VC). Isto permitiu a demonstração dos nucléolos e substância de Nissl de neurônios (CHADI *et al.*, 1993a). Outras séries de secções foram incubadas por 48 horas, sob agitação, a 4°C com um dos marcadores imunoistoquímicos:

1 – antiproteína associada ao crescimento-43 (GAP-43) feito em camundongo (Sigma);

2 – antiproteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2) feito em camundongo (Sigma);

3 - antineurofilamento-200 (NF200) feito em camundongo (Sigma) com contra-coloração pelo VC;

4 - anti-substância P feito em porquinho-da-Índia (Peninsula, EUA) para marcação de terminais e fibras contendo o neuropeptídeo na medula espinhal;

5 - antipeptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) feito em coelho (Sigma);

6 - anti-serotonina (5-HT) feito em coelho (Sigma) para marcação de terminais e fibras serotoninérgicas.

O sistema da imunoperoxidase indireta empregando a avidina-biotina (ABC) (HSU *et al.*, 1981; Vectastain, EUA) foi usado com a 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma) como cromógeno. Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotiniladas (Vector, EUA, diluído 1:200) por uma hora. Essas imunoglobulinas são obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais cujos anticorpos primários foram retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0,5 % Triton X-100. A avidina e uma peroxidase biotinilada foram introduzidas (Vectastain, Vector, EUA; ambas diluídas 1:100) numa terceira incubação durante 45 minutos. A reação foi completada com 0,03% de DAB (Sigma) como cromógeno e H₂O₂ (Sigma) durante 10 minutos. Os procedimentos imunoistoquímicos foram uniformizados. Assim, foi considerado o ponto de saturação do DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo que os

elementos mais escuros das secções cerebrais estivessem inferior a saturação (ZOLI *et al.*, 1990).

3.1.7. *Análise Quantitativa Estereológica*

Esta análise foi utilizada para a quantificação das marcações imunoistoquímicas descritas anteriormente (GUNDERSEN *et al.*, 1988). Para esta análise, foram amostradas as secções do epicentro nos enxertos dos três grupos de animais. As séries de secções imunomarcadas para o neurofilamento, GAP-43, substância P, CGRP e MAP-2 foram analisadas utilizando-se um sistema CAST (Computer Assisted Stereologic Toolbox). Brevemente: Um microscópio Olympus BX50 (Olympus, Dinamarca) conectado a um computador (IBM 330-P75, EUA) e uma câmara de vídeo à cores (JAL 2040, Protec, Japão), ambos ligados a um monitor de vídeo à cores (G70, IBM). Um programa GRID (Interactivision, Silkeborg, Dinamarca) foi utilizado para a geração de uma grade de pontos de análise sobreponível à imagem obtida pela câmara do microscópio no monitor, assim como para controlar os movimentos do porta lâminas do microscópio nos eixos X-Y (Lang, Huttenberg, Alemanha). Um microcator (MT12, Heidenhan, Alemanha) foi ligado ao microscópio com a finalidade de monitorizar os movimentos do porta lâminas do microscópio no eixo vertical (Z).

Toda a área de secção transversal das secções que passavam no epicentro do enxerto (região a ser quantificada) foi demarcada sob magnificação com uma objetiva de 4x. Distâncias para amostragem nos eixos X-Y (250 x 250µm) foram entradas, após o que o programa criou uma série de campos de amostragem uniformes sobre toda a região delimitada. Uma objetiva de imersão de aumento 100x com uma abertura de 1.4 foi usada

para a contagem dos perfis imunorreativos. Grades de pontos com área por ponto de $31,48 \mu\text{m}^2$ nas imunorreatividades da GAP-43, substância P, MAP-2 e CGRP e $55,97 \mu\text{m}^2$ na imunorreatividade do neurofilamento foram usadas. Os pontos que cruzaram os perfis imunorreativos ($\sum P_{\text{estrutura}}$) foram contados. De posse do número total de pontos que atingiram a secção ($\sum P_{\text{secção}}$) pode-se calcular a fração de área das imunorreatividades segundo a fórmula ($\sum P_{\text{estrutura}} / \sum P_{\text{secção}}$) (GUNDERSEN *et al.*, 1988). Ainda, a área de imunorreatividade estimada correspondeu à somatória dos produtos do número de pontos intersectados em cada grade pela área ocupada pelo ponto naquela grade de quantificação.

3.1.8. Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica

A análise semiquantitativa morfométrica e microdensitométrica da imunorreatividade da MAP-2 foi realizada em ambos os lados da medula espinhal, em duas secções transversais por animal, nos cornos anteriores da substância cinza nas porções distais das medulas espinhais enxertadas. Os procedimentos de análise de imagem foram realizados conforme descrito no item 3.2.4..

3.1.9. Análise Qualitativa

A análise qualitativa da imunorreatividade da 5-HT foi realizada com o intuito de investigar a presença de fibras serotoninérgicas no interior dos enxertos, bem como na interface entre o enxerto e os cotos medulares proximais e distais.

3.1.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), usando-se o teste de Fisher para significância estatística entre grupos.

3.2. – Análise da Ativação Glial na Medula Parcialmente Transectada

3.2.1. Procedimento Cirúrgico de Hemiseção Medular

Ratos Wistar adultos e machos (peso aproximado de 245g) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade e luz.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (Merck; 0,6 mg/100 mg de peso, Alemanha) e colocados em uma unidade estereotática para medula espinhal (Kopf, EUA). Utilizando bisturi formado por um fio de aço de tamanho ajustável, montado em um dispositivo específico (Kopf), a metade dorsal das medulas espinhais dos ratos foram lesadas do lado direito (Fig.3B) (n=7) ou foram submetidas a uma operação sham (n=4). Foi realizada laminectomia na região da 11^a vértebra torácica sob magnificação microscópica e o guia do bisturi foi colocado em um plano vertical próximo à superfície lateral da medula espinhal. Este nível foi escolhido de modo a se poder analisar os segmentos craniais e caudais não lesados da medula espinhal. O bisturi foi, então, rodado medialmente, exteriorizado 1,5mm de superfície cortante, sendo a seguir elevado 4,0mm para a transecção parcial da medula espinhal (Fig. 3B). O bisturi foi então retirado, o guia removido e a pele suturada. A cirurgia sham consistiu apenas da laminectomia.

Os animais foram sacrificados 7 dias ou 3 meses após a cirurgia de acordo com técnicas para imunoistoquímica descritas acima (GOMIDE & CHADI, 1999). As medulas dos animais foram reduzidas em segmentos menores, orientadas no eixo rostro-caudal e congeladas, como descrito acima.

Figura 3: Esquema de seções transversas da medula espinhal do rato retirado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986) dos níveis cervical (A), torácico baixo (B) e lombar (C), mostrando a localização dos campos amostrados para a análise microdensitométrica e morfométrica nos experimentos que envolvem a transecção parcial do órgão. A área hachurada representa o local da lesão (B). Para a análise microdensitométrica e morfométrica das imunorreatividades da GFAP e OX42, campos de $2,48 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ foram amostrados nas substâncias cinza e branca de ambos os lados.

3.2.2. *Processamento Tecidual*

Secções adjacentes transversais congeladas de 25µm foram obtidas no criostato (Leica, CM 3000) de toda a medula espinhal de acordo com o Atlas de PAXINOS E WATSON (1986). As secções foram amostradas e montadas sistematicamente durante o seccionamento em lâminas congeladas. Cinco séries em ordem rostro-caudal incluindo cada centésima secção foram utilizadas para a imunoistoquímica de acordo com técnicas já descritas por CHADI *et al.* (1993a).

3.2.3 *Marcação Imunoistoquímica*

3.2.3.1. Imunoistoquímica da GFAP e do OX42

As imunorreatividades foram detectadas pela técnica da avidina-biotina peroxidase como descrito acima. As secções de 2 séries foram então incubadas por 48 horas a 4°C com um dos seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho contra a proteína fibrilar ácida (GFAP) (Dakopatts, Dinamarca) diluído 1:1200 e anticorpo monoclonal de camundongo contra a fração 3 do receptor do complemento (OX42) (Harlan, Reino Unido) diluído 1:1000, que marcam astrócitos e microglia, respectivamente. As secções foram então incubadas com imunoglobulinas biotiniladas de cavalo ou carneiro, contra as espécies hospedeiras dos anticorpos primários, diluídas 1:200 por 2 horas e com o complexo avidina-biotina peroxidase (ambas diluídas 1:100) por 90 minutos. A imunorreatividade foi visualizada com o uso da DAB, como descrito anteriormente.

3.2.3.2. Marcação Fluorescente Dupla para a GFAP e o bFGF

O método de marcação fluorescente simultânea de 2 cores foi utilizado em uma das séries de secções para a detecção simultânea da GFAP e do bFGF como previamente descrito (GOMIDE & CHADI, 1999). Brevemente, as secções foram incubadas por 48h a 4°C com uma mistura de anticorpo policlonal de coelho contra o bFGF (1:600) e anticorpo monoclonal de camundongo contra a GFAP (1:100) (Boehringer Mannheim, Alemanha). O anticorpo para o bFGF é contra a porção n-terminal (resíduos 1 – 24) do peptídeo sintético do bFGF bovino e não reconhece (menos de 1%) a porção ácida do FGF (GONZALEZ *et al.*, 1990). As imunorreatividades foram visualizadas com imunoglobulina de burro anticoelho conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e à imunoglobulina de burro anticamundongo conjugada ao vermelho do Texas (Jackson, EUA) para a demonstração dos anticorpos bFGF e GFAP, respectivamente. As secções foram examinadas em um microscópio de epifluorescência Olympus AX70 (EUA).

3.2.4. Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica

A análise semiquantitativa morfométrica e microdensitométrica das imunorreatividades da GFAP e do OX42 foram feitas em ambos os lados da medula espinhal em duas secções transversais por rato nos níveis rostro-caudais (segmentos cervical (C4), torácico baixo (T12) e lombar (L3)). O nível torácico baixo correspondeu ao nível do local da lesão. Os procedimentos de análise de imagem foram realizados por um analisador de imagem Kontron-Zeiss KS400 (Alemanha) conforme descrição prévia (CHADI *et al.*, 1993b). Resumidamente uma câmera (Prog Res 3008, Alemanha) acoplada ao microscópio adquiriu a imagem das regiões amostradas utilizando objetiva de 40 vezes.

Os campos (Fig. 3) foram selecionados no funículo lateral (substância branca) e no corno anterior da substância cinzenta, bilateralmente. Após a correção da luminosidade, um procedimento de discriminação foi realizado da seguinte forma: o valor médio dos tons de cinza (MGV) e erro padrão médio (e.p.m.) da substância branca e substância cinzenta em áreas da medula espinhal sem marcação específica (background, bg) foi medido. Valores de tons de cinza mais escuros que $bgMGV - 3 \text{ e.p.m.}$ foram considerados como marcação específica e deste modo discriminados. O valor específico do MGV (sp MGV) foi então definido como a diferença entre o bgMGV e o MGV dos perfis imunorreativos discriminados. A análise microdensitométrica foi usada para a detecção do spMGV das imunorreatividades da GFAP e do OX42. Este parâmetro reflete a quantidade da imunorreatividade medida por célula. O valor da lâmina foi mantido constante a 200MGV. O procedimento foi repetido para cada secção a fim de corrigir cada medida de marcação específica para o seu valor de background correspondente. O tamanho dos campos amostrados foi de $2.48 \times 10^4 \mu\text{m}^2$.

Na avaliação morfométrica, as áreas da imunorreatividade dos perfis discriminados da GFAP e do OX42, incluindo citoplasma e processos, foram medidos e expressos como área por unidade de área ($\text{área}/\mu\text{m}^2$). O tamanho do campo amostrado foi descrito acima.

3.2.5. Análise Estatística

Os valores de área e spMGV dos perfis imunorreativos discriminados encontrados nos campos amostrados das 2 secções por nível bilateralmente foram correlacionados após terem sido introduzidos em um eixo X,Y, respectivamente. Os valores foram então

plotados. Os valores plotados dos níveis cervical, torácico baixo e lombar dos grupos sham, 7 dias e 3 meses foram comparados por meio da análise de variância com testes multivariados de significância (Tukey) para a avaliação estatística dos efeitos nos grupos.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. – Enxerto de Células de Schwann na Medula Totalmente Transectada

4.1.1. *Cultura de células de Schwann*

No período de desenvolvimento deste projeto, foi implantado o laboratório de cultura de células no Laboratório de Neuroregeneração do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob supervisão do Professor Gerson Chadi em colaboração com o grupo do Projeto Miami para a Cura da Paralisia da Universidade de Miami, em particular a Professora Mary Bartlet Bunge que supervisionou o estágio de 8 meses realizado naquela instituição. Foi isolado e equipado um dos setores do laboratório a fim de se criar condições ideais para o cultivo das células de Schwann. Foi fundamental a criação de um ambiente de pressão positiva no interior da sala de cultura, medida que contribuiu para um nível zero de contaminação das culturas. O momento utilizado para o transplante destas células foi entre a 2^a e 3^a passagens (Fig 2), uma vez que passagens mais tardias podem levar a alterações genótípicas das células com conseqüentes alterações no seu fenótipo.

4.1.2. *Análise Comportamental Computadorizada*

Os parâmetros motores relacionados ao tempo e agrupados por mês, como o tempo de eventos sem movimentos, o número de eventos sem movimentos, o tempo de eventos de pequenos movimentos, o número de eventos de pequenos movimentos, o tempo

de eventos de grandes movimentos e o número de eventos de grandes movimentos são apresentados na figura 4.

O tempo de eventos sem movimentos do grupo células de Schwann sem o GDNF não apresentou grandes alterações nos 3 primeiros meses de enxerto (Fig.4A). Este parâmetro foi ligeiramente menor (4,8%) no grupo células de Schwann com GDNF em relação ao grupo células de Schwann sem GDNF durante o primeiro mês, diferença que aumentou no mês 2 (10,7%) e mês 3 (17,1%) de pós-operatório (Fig.4A). No mês 2 o grupo fibrina apresentou o parâmetro tempo sem movimentos 12,3% menor em relação ao grupo células de Schwann sem GDNF, enquanto que no mês 3 o grupo células de Schwann com GDNF mostrou este parâmetro também reduzido em relação ao grupo fibrina (Fig.4A).

Diferenças não foram encontradas entre os grupos em relação ao parâmetro número de eventos sem movimentos no primeiro mês de pós-operatório (Fig.4B). O número de eventos sem movimentos mostrou-se 33,3% aumentado no grupo células com GDNF em relação ao grupo fibrina no segundo mês do enxerto (Fig. 4B), entretanto os valores deste parâmetro neste grupo foram 70,1% e 43,8% maiores que o dos grupos fibrina e células de Schwann sem GDNF, respectivamente, no terceiro mês de análise (Fig. 4B).

No segundo mês pós-operatório, o tempo de eventos de pequenos movimentos dos grupos células de Schwann sem e com GDNF foi 40,8% e 50,8% maior, respectivamente, que o grupo fibrina (Fig.4C). No entanto, no terceiro mês do enxerto, os eventos de tempo de pequenos movimentos do grupo células de Schwann com GDNF foram maiores do que aqueles do grupo fibrina (94%) e do grupo células de Schwann sem GDNF (47,2%).

O número de pequenos movimentos já estava aumentado no grupo células de Schwann sem GDNF quando comparado ao grupo fibrina durante o primeiro mês de tratamento (Fig.4D). No segundo mês, este parâmetro motor mostrou-se elevado tanto no grupo células de Schwann sem GDNF (41,6%) como no grupo células com GDNF (44,7%) em relação ao grupo que recebeu enxerto de fibrina. O número de eventos de pequenos movimentos do grupo células de Schwann com GDNF aumentou ainda mais no terceiro mês de análise quando comparado ao grupo fibrina (Fig. 4D), fazendo com que diferença estatística também aparecesse entre o grupo que recebeu o GDNF e aquele com células de Schwann sem o fator neurotrófico (Fig. 4D).

O tempo de eventos de grandes movimentos no grupo células de Schwann com GDNF foi 43,3% maior que o do grupo células sem GDNF durante o primeiro mês pós-operatório (Fig. 4E), diferença esta que aumentou para 74,9% no segundo mês e para 86,3% no terceiro mês pós-operatório (Fig. 4E). Ainda durante o terceiro mês, o tempo de eventos de grandes movimentos do grupo células com GDNF foi 44,7% maior que o do grupo fibrina (Fig. 4E).

Nenhuma diferença foi detectada no número de eventos de grandes movimentos entre os grupos de animais durante o primeiro mês de análise (Fig. 4F). No entanto, no segundo mês de colocação dos enxertos, o grupo células de Schwann com GDNF apresentou número de eventos de grandes movimentos 56,5% maior em relação ao grupo células de Schwann sem GDNF, efeito que foi mais pronunciado (77,9%) durante o terceiro mês de análise (Fig. 4F). Ainda no terceiro mês pós-enxertos, o número de grandes movimentos do grupo células de Schwann com GDNF foi 59,4% maior que aquele obtido pelo grupo fibrina (Fig. 4F).

Figura 4: Os gráficos mostram a evolução temporal das médias e os erros padrões das médias das tomadas agrupadas (por períodos de 1 mês) do tempo sem movimentos (A), número de eventos sem movimentos (B), tempo de pequenos movimentos (C), número de eventos de pequenos movimentos (D), tempo de grandes movimentos (E) e número de eventos de grandes movimentos (F) dos animais que receberam transecção completa da medula espinhal ao nível torácico e receberam tratamentos no local da ferida com: fibrina (FIBRINA), células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e células de Schwann na fibrina com GDNF (CS+GDNF). Teste de comparação múltipla ANOVA e teste Fisher para comparação entre 2 grupos. H $p < 0,05$; HH $p < 0,01$; HHH $p < 0,001$.

4.1.3. Análise Comportamental Dependente do Observador

4.1.3.1. BBB

No terceiro mês de colocação dos enxertos, o teste BBB do grupo células de Schwann sem o GDNF apresentou-se 185% maior em relação ao grupo fibrina (Fig.5A). Ainda no 3º mês, o grupo células de Schwann com o GDNF esteve 257% e 25% maior em relação aos grupos fibrina e células de Schwann sem o GDNF, respectivamente (Fig. 5A).

4.1.3.2. – Teste do plano inclinado

No terceiro mês de colocação dos enxertos, o teste do plano inclinado do grupo células de Schwann sem o GDNF apresentou-se 10,7% maior em relação ao grupo fibrina e o grupo células de Schwann com o GDNF esteve 17,9% e 6,4% maior em relação aos grupos fibrina e células de Schwann sem o GDNF, respectivamente (Fig. 5B).

Figura 5: Os gráficos mostram as médias e os erros padrões das médias do BBB (A; escala 1 a 21 como descrito no texto) e do teste do plano inclinado (B) no terceiro mês de pós-operatório dos animais que sofreram transecção completa da medula espinhal ao nível torácico e tratamento com enxerto de fibrina (FIBRINA), células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e células de Schwann na fibrina com GDNF (CS+GDNF). Teste de comparação múltipla ANOVA e teste Fisher para comparação entre 2 grupos; H $p < 0,05$; HHH $p < 0,001$.

4.1.4. – Análise Estereológica Quantitativa no Epicentro do Enxerto

4.1.4.1. Neurofilamento

Pôde ser constatado que a imunorreatividade ao neurofilamento mostrou fibras distribuídas difusamente por toda extensão do enxerto, sendo que estas fibras eram finas e não orientadas no maior eixo do mesmo. A contra-coloração com o violeta de cresilo mostrou a presença de células com núcleos achatados ou por vezes fusiformes, algumas vezes em contato com as fibras imunorreativas (Figs. 6 e 7). A partir da marcação do neurofilamento no epicentro do enxerto, pôde ser observada uma quantidade maior de fibras nervosas nos grupos que receberam células em relação ao controle (fibrina) e no grupo células com GDNF em relação ao grupo células sem GDNF. Nas bordas distal e proximal dos enxertos pôde ser notado um aumento nos perfis imunorreativos ao neurofilamento que foi semelhante nos três grupos estudados. Finalmente, vasos sanguíneos foram vistos por toda extensão do enxerto e cavidades císticas pareciam em maior número e tamanho nos enxertos de fibrina (Fig. 6).

A análise estereológica quantitativa das fibras imunorreativas para o neurofilamento no epicentro do enxerto mostrou diferenças estatísticas nos parâmetros média de frações de área e área de imunorreatividade estimada (Fig. 8).

Em relação às médias de frações de área, os grupos que receberam células de Schwann na presença e na ausência de GDNF apresentaram valores mais elevados comparativamente ao grupo fibrina de 268,7% e 231,2%, respectivamente (Fig. 8A). No entanto, não foi observada diferença estatística entre o grupo células sem GDNF e células com GDNF (Fig. 8A).

Na análise da área de imunorreatividade estimada, o grupo com células de Schwann e GDNF apresentou valores maiores, 417% e 43% que os grupos fibrina e células sem GDNF, respectivamente. Além disso, o grupo células sem GDNF apresentou área de imunorreatividade estimada 261% maior que o grupo que recebeu enxerto de fibrina apenas (Fig.8B).

Os dados relativos aos parâmetros média de fração de área e área de imunorreatividade estimada relativos à imunorreatividade do neurofilamento também foram inferiores de forma significativa àqueles dos animais controle sem cirurgia (Fig. 8).

Os quocientes entre a área estimada das fibras transversais imunorreativas ao neurofilamento quantificadas na substância branca do nível torácico baixo de animais não lesados e as fibras em todas as direções imunorreativas ao neurofilamento encontradas no epicentro dos ratos enxertados por 3 meses foram 31, 9 e 6 nos grupos fibrina, células sem GDNF e células de Schwann com GDNF respectivamente.

A análise da área total das secções do epicentro dos enxertos analisados não mostrou diferença significativa entre os grupos (fibrina: $5,94 \pm 1,47\text{mm}^2$; células de Schwann sem GDNF: $5,46 \pm 1,32\text{mm}^2$; células de Schwann com GDNF: $6,05 \pm 1,26\text{mm}^2$)

Figura 6: Microfotografias de secções coronais da região do enxerto de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B) e células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C) imunorreativas ao neurofilamento e contra-coradas com violeta de cresilo. Barras: 400 μ m (A-C).

Figura 7: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, da região do enxerto de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B), células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C,D) imunorreativas ao neurofilamento e contra-coradas com violeta de cresilo. Fibras nervosas imunorreativas ao neurofilamento são apontadas (setas). Barras: 50 μ m (A-C), 20 μ m (D).

Figura 8: Figuras mostram o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovida pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. das frações de área (A; M.F.A.), e na área de imunorreatividade estimada (B; A.I.E., mm²) das fibras imunorreativas ao neurofilamento (NF), contra-coradas com o violeta de cresilo, em secção transversal passando pelo epicentro do enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. O teste de comparações múltiplas ANOVA e o teste Fisher para comparação entre 2 grupos foram aplicados; H $p < 0,05$; HHH $p < 0,001$. As médias $\pm$ e.p.m. das M.F.A. e A.I.E. de todas as fibras imunorreativas ao NF da medula torácica correspondente ao nível da lesão de animais não lesados (sem lesão, $n = 4$) para análise da magnitude das fibras regeneradas no interior dos enxertos são também apresentadas.

4.1.4.2. GAP-43

Pôde ser constatado que a imunorreatividade à GAP-43 mostrou fibras distribuídas difusamente por toda extensão do enxerto (Fig. 9). A análise qualitativa mostrou que o grupo de animais que receberam células com GDNF aparentemente apresentou maior quantidade dessas fibras imunorreativas no interior do epicentro dos enxertos comparativamente aos outros dois grupos (Fig. 9). Nas bordas distal e proximal dos enxertos pôde ser notada grande quantidade de perfis imunorreativos à GAP-43, que foi semelhante nos três grupos estudados. No epicentro dos enxertos, estas fibras eram mais finas, delicadas e tortuosas que na borda da lesão. À semelhança da marcação do neurofilamento, as fibras GAP-43 positivas distribuíram-se por todas as direções no epicentro do enxerto (Fig. 9).

A análise estereológica das fibras imunorreativas à GAP-43 no epicentro do enxerto mostrou diferenças estatísticas nos parâmetros média de frações de área e área de imunorreatividade estimada (Fig. 10).

Em relação às médias de frações de área, o grupo que recebeu células na presença de GDNF apresentou valor significativamente maior (186%) em relação ao grupo fibrina (Fig. 10A). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos células sem GDNF e células com GDNF e entre os grupos células sem GDNF e fibrina (Fig. 10A).

Na análise da área de imunorreatividade estimada das fibras imunorreativas à GAP-43, o grupo células com GDNF e células sem GDNF apresentaram valores 259% e 153% maiores que o grupo fibrina, respectivamente (Fig. 10B). Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo células sem GDNF e células com GDNF (Fig. 10B).

A análise da área total das secções do epicentro dos enxertos analisados não mostrou diferença significativa entre os grupos (fibrina: $5,94 \pm 1,47\text{mm}^2$; células de Schwann sem GDNF: $5,46 \pm 1,32\text{mm}^2$; células de Schwann com GDNF: $6,05 \pm 1,26 \text{ mm}^2$).

Figura 9: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, da região do enxerto de animais controle sem lesão (A), com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (B), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (C), células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (D), imunorreativas à proteína associada ao crescimento-43 (GAP-43). Fibras nervosas imunorreativas ao GAP-43 são apontadas (setas). Barras: $50\mu\text{m}$ (A-D).

Figura 10: Figuras mostram o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovida pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. das frações de área (A; M.F.A.), e na área de imunorreatividade estimada (B; A.I.E., mm²) das fibras imunorreativas à proteína associada ao crescimento-43 (GAP-43), em secção transversal passando pelo epicentro do enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. O teste de comparações múltiplas ANOVA e o teste Fisher para comparação entre 2 grupos foram aplicados; H $p < 0,05$; HHH $p < 0,001$.

4.1.4.3. MAP-2

Pôde ser notado que a imunorreatividade à MAP-2 mostrou fibras distribuídas difusamente por toda extensão do enxerto. No epicentro do enxerto, a imunorreatividade da MAP-2 apresentou quantidade maior de fibras nervosas nos grupos que receberam células em relação ao controle e no grupo células com GDNF em relação ao grupo células sem GDNF (Fig. 11).

A análise das fibras imunorreativas à MAP-2 no epicentro do enxerto mostrou diferenças estatísticas nos parâmetros média de frações de área e área de imunorreatividade estimada (Fig. 12).

Em relação às médias de frações de área, o grupo que recebeu células na presença de GDNF apresentou valor mais elevado (109%) comparativamente ao grupo fibrina (Fig. 12A). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos células sem GDNF e células com GDNF, bem como entre os grupos células sem GDNF e fibrina neste parâmetro de quantificação (Fig. 12A).

Na análise da área de imunorreatividade estimada das fibras imunorreativas para a MAP-2 nas secções transversas do epicentro dos enxertos, o grupo células com GDNF apresentou valores maiores, 66% e 138%, que os grupos células sem GDNF e fibrina, respectivamente (Fig. 12B). Não foi observada diferença estatística entre o grupo células sem GDNF e grupo fibrina neste parâmetro.

A análise da área total das secções do epicentro dos enxertos analisados não mostrou diferença estatística entre os grupos (fibrina: $5,94 \pm 1,47\text{mm}^2$; células de Schwann sem GDNF: $5,46 \pm 1,32\text{mm}^2$; células de Schwann com GDNF: $6,05 \pm 1,26\text{mm}^2$).

4.1.4.4. Substância P

Pôde ser constatado que a imunorreatividade à substância P mostrou fibras distribuídas difusamente por toda extensão dos enxertos (Fig. 13). No entanto, número maior de fibras substância P imunomarcadas foi encontrado nas porções caudais quando comparado com as porções craniais dos enxertos nos três grupos de animais. Esta diferença também pôde ser vista nas secções craniais e caudais da medula espinhal perto das bordas dos enxertos. Aparentemente as fibras imunorreativas para a substância P craniais no interior dos enxertos foram mais numerosas nos grupos que receberam células com ou sem GDNF comparativamente ao grupo que recebeu fibrina apenas. Não foi observada diferença qualitativa entre as fibras imunorreativas para a substância P na região cranial dos enxertos entre os grupos que receberam células sem ou com GDNF (Fig. 14).

A partir da marcação da imunorreatividade da substância P no epicentro do enxerto, pôde ser observada uma quantidade de fibras nervosas maior nos grupos que receberam células em relação ao controle e no grupo células com GDNF em relação ao grupo células sem GDNF (Fig. 13).

A análise das fibras imunorreativas para a substância P no epicentro do enxerto mostrou diferenças estatísticas nos parâmetros média das frações de área e área de imunorreatividade estimada (Fig. 15).

Em relação às médias de frações de área foi observado que o grupo células com GDNF apresentou valores maiores, 65,7% e 152,1%, que os grupos células sem GDNF e fibrina, respectivamente (Fig. 15A). Além disso, o grupo células sem GDNF apresentou valor maior (52,1%) que o grupo que recebeu enxerto de fibrina apenas (Fig. 15A).

Na análise da área de imunorreatividade estimada das fibras imunorreativas à substância P, o grupo células com GDNF apresentou valores significativamente maiores,

107% e 197% que os grupos células sem GDNF e fibrina, respectivamente (Fig. 15B). Não foi observada diferença estatística entre o grupo células sem GDNF e grupo fibrina neste parâmetro.

A análise da área total das secções do epicentro dos enxertos analisados não mostrou diferença significativa entre os grupos (fibrina: $5,94 \pm 1,47\text{mm}^2$; células de Schwann sem GDNF: $5,46 \pm 1,32\text{mm}^2$; células de Schwann com GDNF: $6,05 \pm 1,26 \text{mm}^2$).

Figura 11: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, da região do epicentro do enxerto de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B) e células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C) imunorreativas à proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2). Fibras nervosas imunorreativas à MAP-2 são apontadas (setas). Barras: 20 μ m (A-C).

Figura 12: Figuras mostram o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovida pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. das frações de área (A; M.F.A.), e na área de imunorreatividade estimada (B; A.I.E., mm²) das fibras imunorreativas à proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2), em secção transversal passando pelo epicentro do enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. O teste de comparações múltiplas ANOVA e o teste Fisher para comparação entre 2 grupos foram aplicados; H $p < 0,05$; HHH $p < 0,001$.

Figura 13: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, da região do enxerto de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B) e células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C) imunorreativas à substância P. Fibras nervosas imunorreativas à substância são apontadas (setas). Barras: 20 μ m (A-C).

Figura 14: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, das regiões craniais (A-C) e caudais (D-F) aos enxertos de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A,D), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B,E) e células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C,F) imunorreativas à substância P. As fotografias foram obtidas da região da substância branca do funículo posterior da medula espinhal. Fibras nervosas imunorreativas à substância P são apontadas (setas). Barras: 50µm (A-F).

Figura 15: Figuras mostram o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovida pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. das frações de área (A; M.F.A.), e na área de imunorreatividade estimada (B; A.I.E., mm²) das fibras imunorreativas à substância P, em secção transversal passando pelo epicentro do enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. O teste de comparações múltiplas ANOVA e o teste Fisher para comparação entre 2 grupos foram aplicados; H $p < 0,05$; HHH $p < 0,001$.

4.1.4.5. Proteína Relacionada ao Gene da Calcitonina (CGRP)

Pôde ser constatado que a imunorreatividade à CGRP mostrou fibras distribuídas difusamente por toda extensão dos enxertos a semelhança das fibras imunorreativas à substância P (dado não mostrado). No entanto, ocorreu uma maior imunomarcação da CGRP nas porções caudais quando comparadas com as porções craniais dos enxertos nos três grupos de animais (dado não mostrado). Esta diferença também pôde ser vista nas secções craniais e caudais às bordas dos enxertos. Aparentemente as fibras imunorreativas para a CGRP craniais no interior dos enxertos foram mais numerosas nos grupos que receberam células com ou sem GDNF comparativamente ao grupo que recebeu fibrina apenas. Não foi observada diferença qualitativa entre as fibras imunorreativas para a CGRP na região cranial dos enxertos entre os grupos que receberam células sem ou com GDNF.

A partir da marcação da imunorreatividade da CGRP no epicentro do enxerto, não foram observadas diferenças na quantidade de fibras marcadas entre os três grupos estudados. Os parâmetros analisados foram a média das frações de área, área da imunorreatividade estimada (Fig. 16).

A análise da área total das secções do epicentro dos enxertos analisados não mostrou diferença estatística entre os grupos (fibrina: $5,94 \pm 1,47\text{mm}^2$; células de Schwann sem GDNF: $5,46 \pm 1,32\text{mm}^2$; células de Schwann com GDNF: $6,05 \pm 1,26\text{mm}^2$).

Figura 16: Figuras mostram o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovida pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. das frações de área (A; M.F.A.), e na área de imunorreatividade estimada (B; A.I.E., mm²) das fibras imunorreativas à proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP), em secção transversal passando pelo epicentro do enxerto. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. O teste de comparações múltiplas ANOVA e o teste Fisher para comparação entre 2 grupos foram aplicados.

4.1.5. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica da

Imunorreatividade da MAP-2 na Medula Espinhal Caudal ao Enxerto

Pôde ser notado que a imunorreatividade à MAP-2 mostrou fibras distribuídas difusamente na substância cinza nas regiões distais das medulas espinhais enxertadas (Fig. 17). Em relação ao spMGV dos perfis imunorreativos discriminados da MAP-2 nos campos de amostragem da substância cinza nas regiões distais das medulas espinhais enxertadas, o grupo que recebeu células na presença de GDNF apresentou valores mais elevados 19,3% e 9,6% comparativamente aos grupos fibrina e células sem GDNF respectivamente (Fig. 18A). Além disso, o grupo que recebeu células na ausência do GDNF apresentou valor mais elevado (8,8%) comparativamente ao grupo fibrina neste parâmetro de quantificação (Fig. 18A).

Na análise da área de imunorreatividade dos perfis imunorreativos discriminados da MAP-2 nos campos de amostragem da substância cinza nas regiões distais das medulas espinhais enxertadas, o grupo que recebeu células na presença de GDNF apresentou valores mais elevados 45,6% e 23,2% comparativamente aos grupos fibrina e células sem GDNF respectivamente (Fig. 18B). Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo células sem GDNF e o grupo fibrina neste parâmetro de quantificação (Fig. 18B).

Figura 17: Microfotografias de secções coronais, em grande aumento, de regiões da medula espinhal caudais (região lombar) aos enxertos de animais com transecção completa da medula espinhal e tratados com fibrina (A), células de Schwann na fibrina na ausência do fator neurotrófico GDNF (B) e células de Schwann na fibrina na presença do fator neurotrófico GDNF (C) imunorreativas à proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2). Fibras nervosas imunorreativas à MAP-2 são apontadas (setas). Barras: 50µm (A-C).

Figura 18: Figura mostra o efeito da colocação de enxerto de fibrina (FIBRINA), de células de Schwann na fibrina sem o fator neurotrófico GDNF (CS-GDNF) e de células de Schwann na fibrina com o GDNF (CS+GDNF) na solução de continuidade (4mm) promovido pela transecção total da medula espinhal do rato na média $\pm$ e.p.m. dos valores de tons de cinza (spMGVs) (A) e na somatória das áreas (μm^2) (B) dos perfis discriminados da imunorreatividade da MAP-2 na substância cinza (corno anterior) do nível caudal da medula espinhal em secção transversal. Os animais foram sacrificados 3 meses após a cirurgia. Média $\pm$ e.p.m. Teste de comparações múltiplas ANOVA e teste Fisher para comparação entre 2 grupos; HH $p < 0,01$; HHH $p < 0,001$.

4.1.6. – *Análise Qualitativa da Imunorreatividade da 5-HT*

Número reduzido de fibras imunorreativas à 5-HT foi observado no interior dos enxertos. Em função disto a quantificação destas fibras não foi realizada no epicentro do enxerto. Em acréscimo, a imunomarcção das fibras e terminais serotoninérgicos foi observada apenas nas porções craniais das medulas espinhais enxertadas quando comparadas às porções caudais (Fig. 19), sendo que estas fibras não foram encontradas nos segmentos das medulas espinhais distais ao enxerto.

Figura 19: Microfotografias de secções coronais, da região cranial (A) e caudal (B) da medula espinhal de animal que recebeu enxerto de fibrina com GDNF após transecção completa da medula espinhal, imunorreativas à 5-HT. Terminais pré-sinápticos e fibras imunorreativas à 5-HT são observadas apenas em regiões da medula espinhal craniais ao enxerto (setas). Note-se a ausência de fibras imunorreativas à 5-HT na secção caudal ao enxerto. Barras: 50µm.

4.2. – Análise da Ativação Glial na Medula Parcialmente Transectada

4.2.1. – Análise Semiquantitativa Morfométrica e Microdensitométrica

4.2.1.1. Análise da imunorreatividade do OX42

Tanto na substância branca (Fig. 20A,D) quanto na substância cinza da medula espinhal dos animais sham operados, a imunorreatividade do OX42 foi encontrada nas células que emitiam processos finos e pouco ramificados. Os perfis imunorreativos ao OX42 foram vistos homogeneamente distribuídos por toda a região da medula espinhal, nas substâncias branca e cinza nos ratos do grupo sham.

Nos ratos que receberam a transecção parcial da medula espinhal ao nível T11-12, os perfis imunorreativos ao OX42 mostraram um citoplasma aumentado e processos espessos em todos os segmentos estudados da substância branca da medula espinhal e bilateralmente (Fig. 20B,C,E,F). A imunorreatividade ao OX42 mostrou-se ainda mais aumentada nas regiões de substância branca próximas à lesão (Fig. 20B,C). Um grande aumento de vários perfis imunorreativos ao OX42 de forma arredondada e sem processos foram encontrados na borda da lesão nos ratos do grupo 7 dias (Fig. 20B). Um padrão similar de presença aumentada da imunorreatividade ao OX42 foi visto na substância cinzenta dos ratos lesados, entretanto, perfis imunorreativos arredondados sem processos não foram observados.

Os testes multivariados indicaram diferenças estatísticas nos valores plotados de spMGV/área, conforme determinado pela análise de imagem microdensitométrica e morfométrica dos perfis imunorreativos do OX42 discriminados nos campos amostrados

das substâncias branca e cinza das regiões cervical, torácica baixa e lombar da medula espinhal dos ratos dos grupos sham, 7 dias e 3 meses (Fig 21).

Sete dias após a lesão parcial da medula espinhal, o spMGV dos perfis imunorreativos discriminados do OX42 estavam aumentados nos campos de amostragem das substâncias branca e cinza nas regiões cervical, torácica baixa e lombar bilateralmente, comparativamente aos ratos do grupo sham (Figuras 20, 21, Tabela 1). Três meses após a lesão, os valores da substância branca mostraram-se ainda elevados nos níveis cervical e lombar mas diminuídos no nível torácico baixo, e aqueles da substância cinzenta estavam diminuídos nos 3 níveis estudados comparativamente aos ratos hemitransectados do grupo 7 dias. (Figuras 20, 21; Tabela 1).

A área dos perfis imunorreativos discriminados ao OX42 nos campos amostrados da substância branca da medula espinhal estava elevada no nível torácico baixo dos ratos lesados do grupo 7 dias e também em todos os níveis estudados do grupo lesado e sacrificado 3 meses após, entretanto os aumentos relacionados ao tempo na área de imunorreatividade do OX42 na substância branca foi menos pronunciado ($p = 0.051$) no nível torácico próximo à lesão (Figuras 20, 21; Tabela 1). Além disso, aumentos na área dos perfis imunorreativos do OX42 foram encontrados nos campos amostrados da substância cinzenta no nível da lesão medular e abaixo dele, que se atenuaram no grupo 3 meses uma vez que os valores deste período tardio foram diferentes daqueles do grupo sham (Figuras 20, 21; Tabela 1).

Figura 20: Microfotografias mostrando a imunoreatividade do OX-42 na substância branca (A-F) e da GFAP astroglial (G-L) no nível da lesão (A,B,C,G,H,I) e no nível torácico alto (D,E,F,J,K,L) em secções transversas da medula espinhal de ratos adultos submetidos à cirurgia simulada (sham) (A,D,G,J) ou à transecção parcial da medula espinhal no nível torácico baixo (T11) (B,C,E,F,H,I,K,L). As setas apontam para os perfis microgliais imunorreativos ao OX-42 microglial (A-F) e astrogliais da GFAP (G-L). Barras: 10µm.

Figura 21: Efeitos da transecção parcial da medula espinhal do rato com valores plotados da correlação entre o spMGV e a área dos perfis imunorreativos discriminados do marcador microglial OX-42 nas substâncias branca (A-I) e cinza (J-R) nos níveis cervical, torácico baixo (nível da lesão) e lombar 7 dias e 3 meses após a cirurgia. Dados dos ratos do grupo sham foram agrupados n= 4-7.

Tabela 1. Diferenças estatísticas pelo teste de Tukey usando comparações múltiplas dos valores da análise de imagem após a hemitransecção da medula espinhal.

			Sham				3 meses			
			spMGV		Área		spMGV		Área	
			Branca	Cinza	Branca	Cinza	Branca	Cinza	Branca	Cinza
OX42	Cervical	7 dias	< 0.001	< 0.001	0.126	0.242	< 0.001	< 0.001	0.938	0.031
		3 meses	< 0.001	< 0.001	0.032	0.755				
	Torácico Baixo	7 dias	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.545	< 0.001	< 0.001	0.051	< 0.001
		3 meses	< 0.001	< 0.001	0.005	< 0.001				
	Lombar	7 dias	< 0.001	< 0.001	0.297	0.008	< 0.001	< 0.001	0.272	0.022
		3 meses	< 0.001	< 0.001	0.011	< 0.001				
GFAP	Cervical	7 dias	< 0.001	< 0.001	0.992	0.269	< 0.001	< 0.001	0.527	0.035
		3 meses	< 0.001	< 0.001	0.514	< 0.001				
	Torácico Baixo	7 dias	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.055
		3 meses	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001				
	Lombar	7 dias	< 0.001	< 0.001	0.002	0.223	< 0.002	0.001	0.902	0.912
		3 meses	< 0.001	< 0.001	0.001	0.073				

Legenda: Análise de imagem semiquantitativa microdensitométrica e morfométrica para detecção do valor de cinza específico (spMGV) e da área das imunorreatividades do OX42 e da GFAP. Os valores de p observados entre os grupos Sham versus 7 dias, Sham versus 3 meses e 3 meses versus 7 dias relativos ao spMGV e às áreas de imunorreatividades nas substâncias cinza e branca dos níveis cervical, torácico baixo e lombar foram obtidos usando-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. n = 4-7.

4.2.1.2. Análise da Imunorreatividade da GFAP

A análise da imunorreatividade da GFAP na substância branca da medula espinhal dos ratos do grupo sham demonstrou perfis imunorreativos semelhantes a astrócitos fibrosos (Figs. 20G, J). Os perfis imunorreativos para a GFAP apresentaram-se escassamente e homogeneamente distribuídos ao longo da substância branca. Estas células eram alongadas e com citoplasma pequeno tendo acumulado pequena quantidade de imunorreatividade da GFAP além de finos processos. Foram vistas ramificações primárias e secundárias destes perfis. A imunorreatividade da GFAP mostrou-se aumentada bilateralmente na substância branca da medula espinhal dos animais dos grupos lesados 7 dias e 3 meses após a cirurgia (Figs. 20H, I, K, L). Os aumentos mais pronunciados da imunorreatividade da GFAP aconteceram em regiões de substância branca próximas à lesão, tendendo a diminuir em ambos os sentidos cranial e caudal a partir dela (Figs. 20G-L).

Perfis imunorreativos à GFAP, semelhantes a astrócitos protoplasmáticos, foram achados homogeneamente distribuídos na substância cinzenta dos diferentes níveis da medula espinhal dos ratos do grupo sham. Do mesmo modo que na substância branca estes perfis mostraram citoplasma fino e processos ramificados.

A imunorreatividade da GFAP também se mostrou aumentada, bilateralmente, em todos os níveis rostro-caudais dos ratos lesados, notavelmente na substância cinzenta próxima à lesão. O aumento observado na imunorreatividade da GFAP nas substâncias branca e cinza dos ratos lesados se deveu a um aumento nos perfis imunorreativos da GFAP que mostraram citoplasma aumentado e processos mais ramificados e grossos (Figs. 20H, I, K, L).

O teste multivariado mostrou diferenças estatísticas nos valores plotados de spMGV/área, como determinado pela análise de imagem microdensitométrica e morfométrica dos perfis imunorreativos da GFAP discriminados nos campos amostrados das substâncias branca e cinza dos níveis dos níveis cervical, torácico e lombar da medula espinhal dos ratos dos grupos sham, 7 dias e 3 meses (Tabela 1).

O spMGV dos perfis imunorreativos à GFAP discriminados mostrou-se aumentado nos campos amostrados das substâncias branca e cinza dos três níveis estudados da medula espinhal dos animais dos grupos 7 dias e 3 meses comparativamente ao grupo sham (Figs. 20, 22; tabela 1). Três meses depois da lesão, os valores mostraram-se menores na substância branca dos níveis cervical e lombar como também na substância cinzenta de todos os níveis estudados, porém estavam aumentados na substância branca do nível torácico baixo comparativamente ao grupo 7 dias (Figs. 20, 22; Tabela 1).

A área dos perfis imunorreativos à GFAP mostrou-se aumentada nos campos amostrados da substância branca dos níveis torácico baixo e lombar dos grupos lesados de 7 dias e 3 meses (Figs. 20, 22; tabela 1) comparativamente aos ratos do grupo sham, porém só houve diferença estatística ao nível da lesão no grupo 3 meses (Figs. 20, 22; tabela 1). Além disso, aumentos na área de imunorreatividade da GFAP foram achados na substância cinzenta no nível torácico baixo 7 dias e 3 meses depois de lesão que pareceu estar ($p = 0,055$) relacionado com a progressão do tempo pós-cirurgia (Fig. 22; tabela 1).

Figura 22: Efeitos da transecção parcial da medula espinhal do rato com valores plotados da correlação entre o spMGV e a área dos perfis imunorreativos discriminados do marcador astroglial GFAP nas substâncias branca (A-I) e cinza (J-R) nos níveis cervical, torácico baixo (nível da lesão) e lombar 7 dias e 3 meses após a cirurgia. Dados dos ratos do grupo sham foram agrupados n= 4-7.

4.2.1.3. Análise da Marcação Dupla Fluorescente para Detecção Simultânea do bFGF e da GFAP

A análise da coexistência das imunorreatividades do bFGF e da GFAP por meio da técnica de imunofluorescência com marcação dupla, usando-se 2 fluoróforos diferentes, demonstrou a presença de imunorreatividade de bFGF de intensidade fraca a moderada no núcleo da vasta maioria dos perfis astrogliais imunorreativos à GFAP em todas as regiões da medula espinhal dos ratos do grupo sham (Fig. 23). Nas substâncias branca e cinzenta dos ratos lesados do grupo 7 dias, imunorreatividade do bFGF de intensidade moderada a forte foi observada no núcleo dos perfis astrogliais imunorreativos à GFAP que por sua vez mostraram um aumento do seu citoplasma e de seus processos (Fig. 23). A intensidade da imunorreatividade ao bFGF aumentou no interior dos núcleos das células imunorreativas à GFAP, que também acumularam quantidade maior de GFAP principalmente em locais mais próximos ao local da lesão. Além disso, imunorreatividade ao bFGF mais forte foi observada no interior de astrócitos reativos do grupo 3 meses apenas próximo à região da lesão.

Secções de experimentos controle que foram incubadas com anticorpo bFGF pré-absorvido com bFGF recombinante humano não mostraram imunorreatividade. Além disso, secções incubadas com o solvente das soluções primárias e secundárias de anticorpos ou da solução de avidina-biotina não mostraram marcação específica.

Figura 23: Microfotografias mostrando a marcação imunofluorescente de 2 cores nas secções transversas das substâncias brancas das medulas espinhais de ratos submetidos à cirurgia simulada (A,B) ou à transecção parcial da medula espinhal (C,D) no nível torácico baixo para a detecção simultânea das imunorreatividades do fator de crescimento derivado dos fibroblastos (bFGF; A,C) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP; B,D). Astrócitos marcados com GFAP mostram imunorreatividade nuclear ao bFGF (setas). Astrócitos reativos dos animais lesados apresentaram maior imunomarcação do bFGF (C,D).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou a avaliação do potencial regenerativo das células de Schwann na presença e na ausência do fator neurotrófico GDNF no modelo experimental de lesão medular por transecção completa do órgão.

Apesar das células de Schwann serem as responsáveis pela mielinização dos axônios periféricos, já se demonstrou que elas também podem remielinizar axônios do sistema nervoso central (BLAKEMORE, 1977). Embora as células de Schwann mielinizem apenas um axônio, contrastando com os oligodendrócitos, o transplante destas células cultivadas na medula espinhal desmielinizada pode restabelecer as propriedades de condução nervosa normais (HONMOU *et al.*, 1996; KOHAMA *et al.*, 2001).

As células de Schwann podem ser obtidas dos nervos, constituindo o seu cultivo uma alternativa importante para o estudo em modelos experimentais e para o uso no tratamento de pacientes com lesão medular. Além da facilidade de obtenção, estas células podem facilmente ser cultivadas, multiplicadas e estocadas para uso futuro (KOHAMA *et al.*, 2001).

As pontes de células de Schwann cultivadas são usadas com sucesso na união de cotos medulares completamente separados em modelos animais (XU *et al.*, 1995, 1997). O mecanismo celular relacionado à regeneração se baseia nas interações cooperativas entre os axônios e as células de Schwann, que envolvem a produção de fatores neurotróficos e outras moléculas associadas (DEZAWA, 2002).

A facilidade na obtenção das células de Schwann, a partir do nervo, contrasta com a das células tronco fetais, alternativa em desenvolvimento para o tratamento da lesão medular (STANGEL & HARTUNG, 2002). Além das questões éticas relacionadas à obtenção das células fetais, cientistas ainda não têm o domínio completo das técnicas para

a multiplicação e para o direcionamento destas células para um tipo celular específico desejado (STANGEL & HARTUNG, 2002; DIETRICH, 2001). Ao contrário das células de Schwann, as células tronco têm uma sobrevida limitada devido à falta de sinais químicos específicos no ambiente do transplante, estando sendo atualmente desenvolvidas técnicas para melhorar a sobrevida destas células através do tratamento com fatores neurotróficos (SAGEN, 2003).

Os efeitos promotores das células de Schwann sobre o crescimento axonal, na medula espinhal, já foram demonstrados em vários modelos experimentais em ratos adultos (BUNGE 2001; PLANT *et al.*, 2001), constituindo uma opção terapêutica importante experimental e clinicamente. De forma semelhante, o uso combinado de populações purificadas de células de Schwann e dos fatores neurotróficos mostram bons resultados na regeneração de vias medulares específicas (XU *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem que células de Schwann, inoculadas em presença de estímulo trófico adequado, favorecem a regeneração de fibras nervosas lesadas na medula espinhal.

A transecção completa da medula espinhal, com a criação de uma solução de continuidade de 4mm entre os cotos lesados, foi realizada neste trabalho, método mais indicado para a análise da regeneração de tratos axonais (KWON *et al.*, 2002), em contraste com os modelos de contusão medular, os quais preservam axônios em grau variável, mais propício para investigar fenômenos neurodegenerativos/neuroprotetivos (JAKEMAN *et al.*, 1998).

O efeito do enxerto de células de Schwann sobre a recuperação funcional nos membros inferiores de ratos já foi previamente avaliado, utilizando-se métodos específicos (TAKAMI *et al.*, 2002). Discute-se que o número de axônios preservados e regenerados a partir de núcleos do tronco encefálico e mesmo do córtex cerebral, assim como axônios

proprioespinais locais, constituem um fator importante no grau de recuperação funcional dos animais com lesão medular e tratados (SARUHASHI & YOUNG, 1994; BASSO *et al.*, 1996, GOLDBERGER, 1988; HELGREN & GOLDBERGER, 1993).

Neste trabalho, foi observado um número maior de fibras nervosas imunorreativas no epicentro dos enxertos dos grupos que receberam células de Schwann comparativamente àquele que recebeu fibrina apenas. Além disso, os grupos que receberam os enxertos com células apresentaram melhor performance motora comparativamente ao grupo fibrina, o que está de acordo com achados já descritos na literatura (TAKAMI *et al.*, 2002).

Deste modo, o potencial regenerativo das células de Schwann inoculadas na medula espinhal lesada está associado à capacidade de induzir a ramificação e a extensão dos brotamentos axonais no interior do enxerto, de estimular a produção de fatores neurotróficos, inclusive o GDNF, fator utilizado no presente trabalho, e, ainda, de atenuar a formação da cicatriz glial no local do trauma (RAISMAN, 1997; MARTIN *et al.*, 1996; BUNGE, 2001; WIDENFALK *et al.*, 2001; HÖKE *et al.*, 2003).

O suporte dado pelos fatores neurotróficos é sabidamente importante na preservação dos neurônios axotomizados e no crescimento de suas fibras nervosas, favorecendo um microambiente propício à regeneração (CHENG *et al.*, 1996). Vários autores demonstraram experimentalmente que os fatores neurotróficos podem estimular o crescimento de fibras do trato córtico-espinhal em estágios crônicos de lesão, além de propiciar graus variáveis de recuperação funcional (TUSZYNSKI *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2002). O maior crescimento de fibras nos ratos que receberam enxertos com células de Schwann comparativamente aos ratos do grupo controle fibrina, observado neste estudo, pode estar relacionado à produção de fatores neurotróficos por estas células,

além da modulação do microambiente local por elas, o que está de acordo com relato da literatura (PENG *et al.*, 2003).

Além disso, as células gliais (astrócito e microglia) modulam o processo inflamatório subsequente à lesão e são responsáveis pelo fechamento das barreiras encefálicas e estabilização da lesão (PRAT *et al.*, 2001). Sabe-se que a extensão da neurodegeneração secundária após a lesão medular depende da magnitude dos eventos inflamatórios locais (DAVIES *et al.*, 1996). Os astrócitos e a microglia merecem uma atenção especial quanto ao seu papel nas fases agudas e crônicas da lesão da medula espinhal, principalmente no que diz respeito à promoção da cicatriz glial, em contraste com suas propriedades promotoras de crescimento de fibras nervosas (PARK *et al.*, 2001; DOUGHERTY *et al.*, 2000).

A ativação espacial e temporal duradouras destas células da neuroglia e também as diferenças morfológicas delas no seu estado reativo, próximo e longe do local da lesão sugerem que elas possam desempenhar funções diferenciais nos períodos subsequentes ao trauma (DOUGHERTY *et al.*, 2000). Além disso, o papel da microglia nos eventos tróficos parácrinos na medula espinhal já foi postulado (ZACHARY *et al.*, 1997), sendo possível que a reação microglial vista na medula espinhal, particularmente próximo ao local da lesão esteja relacionada às propriedades promotoras ao crescimento de fibras exercidas por elas, além do seu efeito fagocítico clássico.

O tipo de ativação microglial que se observou neste trabalho, pelo aumento na área de células microgliais imunorreativas (hipertrofia e hiperplasia) e pelo aumento do spMGV da imunoreatividade do OX-42 nas substâncias branca e cinza, estão de acordo com estas observações, uma vez que estimulação à regeneração axonal já foi atribuída à microglia ou ao meio de cultura por ela condicionado (ELKABES *et al.*, 1996).

A infiltração astrogliar subsequente à lesão do SNC é bem conhecida e contribui para a formação de uma barreira física ao crescimento axonal (RUDGE & SILVER, 1990). Por outro lado, os efeitos dos astrócitos quanto à secreção de substâncias com atividades neurotróficas, que podem estimular o crescimento axonal, e inibitórias ao crescimento de fibras parecem paradoxais à primeira vista, já que ao mesmo tempo em que impedem as fibras de se degenerarem, bloqueiam seu crescimento através do local da lesão (FAWCETT & ASHER, 1999).

Apesar do fato da cicatriz glial, que ocorre após a lesão do SNC, poder interferir no crescimento de fibras axonais lesadas, postula-se que as células gliais reativas nas vias lesadas podem favorecer a plasticidade neuronal e o trofismo local, possivelmente pela proteção do tecido nervoso lesado do processo de degeneração secundária (MOONEN *et al.*, 1990; LEME & CHADI, 2001). Levando em conta a maior quantidade de fibras observadas no epicentro dos enxertos dos grupos que receberam células de Schwann na presença ou na ausência do GDNF e, associando-se estes achados ao fato das células de Schwann determinarem uma ativação astrocitária menor (MARTIN *et al.*, 1993, 1996), pode-se especular que a presença das células de Schwann associadas ou não ao GDNF podem agir como agentes moduladores do processo inflamatório no local da lesão. A modulação da ativação astrocitária se manifestaria em última análise como uma formação de cicatriz glial menor, constituindo assim um meio mais permissivo ao crescimento dos axônios em regeneração. Enquanto isso, a ativação glial que ocorre à distância da lesão, e portanto alheia aos efeitos locais das células de Schwann, estaria mantida favorecendo a plasticidade e o trofismo neuronal das vias lesadas e dos microcircuitos presentes na substância cinza do órgão, podendo, deste modo, promover efeitos neurofuncionais/comportamentais desejáveis, como observado neste trabalho.

A correlação entre a área e o spMGV da imunorreatividade da GFAP na substância branca da medula espinhal no nível da hemitransecção parcial com 3 meses indica que a cicatriz glial não é uma formação transitória, mas pode persistir por um longo período de pós-operatório (BARRET *et al.*, 1984). As análises morfométrica e microdensitométrica de imagem descritas no local da lesão após a hemitransecção parcial está de acordo com as descrições prévias em relação à cicatriz glial que margeia a lesão do SNC e que consiste de astrócitos hiperfilamentosos compactados com muitos dos seus processos se entrelaçando formando junções apertadas, em um limitado espaço extracelular (FAWCETT & ASHER, 1999).

A análise quantitativa de imagem usada neste trabalho mostrou a ativação astrogliar que pode ocorrer nas substâncias branca e cinza bilateralmente à hemitransecção parcial, em todos os níveis estudados da medula, mesmo em regiões distantes do local da lesão. Estes achados sugerem a ocorrência de uma ativação astrogliar em todo o órgão após uma lesão circunscrita. Estes achados estão de acordo com a descrição clássica que mostra alterações morfológicas e funcionais nas populações de células gliais após a lesão ou manipulação do SNC (SHAO & MCCARTHY, 1994) e que astrócitos reativos podem ser observados em regiões do tecido nervoso não diretamente relacionadas à lesão (RIVA *et al.*, 1994), indicando que sinais que desencadeiam a reação astrocitária ultrapassam os territórios da neurodegeneração.

O presente trabalho contribui com uma descrição regional e temporal da ativação astrogliar e microglial nas substâncias cinza e branca de toda a medula espinhal próximo e distante ao local da lesão. Deve ainda ser enfatizada a semelhança do padrão de ativação da microglia e do astrócito após a hemitransecção parcial da medula espinhal realizada neste

estudo, que sugere uma possível interação entre estas duas populações de células gliais reativas nos eventos tróficos do SNC lesado (GIULIAN *et al.*, 1993).

Foi ainda observado aqui que astrócitos reativos encontrados próximos ao local da lesão medular ou em áreas craniais ou caudais à lesão podem produzir quantidade aumentada do fator neurotrófico bFGF, o que está em pleno acordo com publicações prévias que mostraram uma produção aumentada do fator pelos astrócitos após lesões encefálicas (CHADI *et al.*, 1994; HUMPEL *et al.*, 1994). Além disso, nossos resultados estão de acordo com os achados de KOSHINAGA E WHITTEMORE (1995) que mostraram elevação no bFGF intracelular em astrócitos reativos localizados ao redor da área de lesão e de tratos de fibras em processo de degeneração Walleriana, porém estende os achados para áreas da substância cinzenta da medula espinhal em níveis distantes da hemitransecção parcial.

As ações neurotróficas do bFGF em populações neuronais de cérebros lesados são descritas extensivamente (CHADI *et al.*, 1993a, 1994). É possível que as ações tróficas do bFGF astrocitário nas substâncias branca e cinza da medula espinhal lesada podem favorecer a manutenção de neurônios de projeção e ao rearranjo das conexões neuronais em todo o órgão em longo prazo.

Desta forma, a presente análise levanta a possibilidade da ativação dos astrócitos desencadear via o bFGF, ações tróficas parácrinas que podem estar relacionadas aos eventos de cicatriz e reparação no local da lesão. Em locais distantes a ela, entretanto, a ativação astrocitária pode ajudar a manter vivos os neurônios da substância cinzenta e, ainda, estimular o crescimento de suas fibras. Um efeito astrogliotrófico parácrino pode ocorrer em toda a substância branca da medula espinhal, um fenômeno que dura por um período longo após a lesão, indicando uma necessidade mantida de suporte trófico pelas

fibras lesadas e também não lesadas. Estas observações estão de acordo com os achados de que a administração de fatores neurotróficos aumenta a regeneração de fibras na medula espinhal de ratos lesados (CHENG *et al.*, 1996).

Existem relatos de que a secreção aumentada de GDNF pelas células de Schwann está relacionada a situações de degeneração ou regeneração de nervos, mesmo, *in vitro*, quando cultivadas na ausência de axônios de neurônios (WILBY *et al.*, 1999). A produção de fatores neurotróficos pelas células de Schwann isoladas ou em nervos, quando implantados no SNC não foi estudada em detalhes, mas há relato de que estas células quando transplantadas expressam menos c-jun e outros genes de expressão primária associados à produção de fatores neurotróficos (VAUDANO *et al.*, 1995, 1996). Deste modo, é possível que células transplantadas produzam fatores neurotróficos em quantidades menores, sendo necessária a manipulação gênica para que venham a expressar mais fatores (WILBY *et al.*, 1999).

Embora o GDNF seja um componente essencial da atividade neurotrófica promovida pelas células de Schwann, não é o único fator secretado por elas com este propósito. Isto foi demonstrado pelo fato de que em camundongos sem células de Schwann, a perda de motoneurônios foi maior que em camundongos que tiveram o gene do GDNF nocauteado (RIETHMACHER *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1996; SANCHEZ *et al.*, 1996).

O sucesso no tratamento da lesão medular provavelmente virá da associação das propostas terapêuticas que hoje estão sendo investigadas. Desta forma, o emprego do enxerto de células com o suprimento local de fatores neurotróficos constitui uma

alternativa a ser investigada (XU *et al.*, 1995). O presente modelo experimental analisou o efeito da associação do enxerto de células de Schwann com o fator neurotrófico GDNF.

Estudos recentes, utilizando modelos de contusão sugerem um papel importante do GDNF na melhora dos padrões motores em ratos adultos (CHENG *et al.*, 2002). No presente trabalho, os resultados mostraram que o transplante de células de Schwann associado ao emprego local de GDNF, no modelo de transecção medular completa, constitui um avanço terapêutico experimental para o favorecimento do maior crescimento de fibras nervosas no epicentro do enxerto. Esta associação, células de Schwann-GDNF, mostrou-se mais efetiva que o enxerto isolado de células de Schwann na promoção do crescimento de fibras nervosas no epicentro do enxerto e também na recuperação funcional dos ratos estudados.

A administração de GDNF no tecido nervoso de ratos pode mudar o fenótipo dos axônios de não mielinizados para mielinizados (HÖKE *et al.*, 2003). Uma maior mielinização dos processos axonais no interior dos enxertos pode também ser relacionado com a melhora funcional observada nos grupos que receberam células de Schwann neste estudo, já que as células de Schwann produzem o GDNF. Além disso, o melhor desempenho motor observado entre os animais que receberam enxertos com as células de Schwann e GDNF comparativamente ao grupo células sem o GDNF poderia também estar sendo explicado por uma maior mielinização das fibras no interior do enxerto nervoso (MCDONALD *et al.*, 1999; HÖKE *et al.*, 2003) em associação à resposta plástica diferencial do tecido medular não lesado no grupo que recebeu células e o GDNF, conforme discussão mais à frente. As análises aqui expostas foram feitas em um período de três meses de pós-operatório, sendo possível que modelos experimentais com tempos de

observação mais prolongados possam apresentar resultados ainda mais significativos em relação ao grau de regeneração/desempenho motor (CHENG *et al.*, 1996).

Um outro mecanismo pelo qual o grupo GDNF teve respostas regenerativas e comportamentais melhores pode ter sido determinado pelo potencial dos fatores neurotróficos impedirem a morte neuronal retrógrada que ocorre logo após uma lesão (GUEST *et al.*, 1997). O fato de determinadas fibras não terem atrofiado nas extremidades dos cotos medulares pode ter sido também responsável pela maior quantidade de fibras axonais observada no interior dos enxertos.

Apesar do efeito benéfico do GDNF na melhora motora das patas traseiras dos animais analisados, como demonstrado no presente estudo, a dose ideal de GDNF e o melhor modo de administração do fator para a melhor resposta funcional precisam ainda ser analisados com mais detalhes.

Outros autores já demonstraram em modelos de Doença de Parkinson que o implante estriatal de populações de células de Schwann aumenta de forma importante a densidade das fibras nervosas na região do enxerto, fato este que é grandemente potencializado na presença do fator neurotrófico GDNF (WILBY *et al.*, 1999), achados que estão de acordo com as observações obtidas no presente estudo.

Já foi sugerido que um dos motivos da dificuldade da regeneração de fibras sensitivas e motoras do SNP cronicamente denervado se deva à insuficiência relativa das células de Schwann manterem o suporte trófico desejado (HÖKE *et al.*, 2002). A presença de receptores para o GDNF nas células de Schwann já foi demonstrada (WIDENFALK *et al.*, 2001; HASE *et al.*, 1999; HÖKE *et al.*, 2002). É provável que a administração exógena de GDNF tenha agido também através destes receptores, estimulando cadeias de sinalização extracelulares e ativando estas células (WIDENFALK *et al.*, 2001; HASE *et*

al., 1999; HÖKE *et al.*, 2002). As células de Schwann ativadas poderiam se dividir e aumentar seu número no local do enxerto, e ainda virem a produzir quantidades aumentadas do GDNF e de outros fatores neurotróficos a serem liberados no interior do enxerto (WIDENFALK *et al.*, 2001; HASE *et al.*, 1999; HÖKE *et al.*, 2002).

A maior quantidade de fibras imunorreativas ao neurofilamento encontradas no epicentro dos enxertos do grupo células com GDNF sugerem a ação estimulatória do fator sobre o crescimento das fibras no interior do enxerto (CHENG *et al.*, 2002).

A expressão da GAP-43 está associada a processos como a sinaptogênese, alongamento axonal, regeneração, brotamento e direcionamento de cones de crescimento, sendo marcante a sua expressão durante o desenvolvimento do sistema nervoso (CASSAM *et al.*, 1999). A função da GAP-43 no tecido nervoso do adulto é desconhecida, sendo encontrada em uma população limitada de neurônios centrais, particularmente na medula espinhal não lesada, sugerindo uma expressão gênica residual (CASSAM *et al.*, 1999). As diferenças observadas neste trabalho entre os grupos analisados na região do epicentro do enxerto quanto à expressão da GAP-43 são consistentes com o brotamento axonal, indicando um efeito potencializador das células de Schwann e do GDNF sobre o crescimento axonal. A quantidade maior de fibras imunorreativas à MAP-2 no interior do enxerto reafirma a presença de um maior número de fibras invadindo o enxerto. Há de se notar que as fibras imunorreativas encontradas no interior do enxerto não apresentavam trajetória orientada ao longo do eixo longitudinal do mesmo na medula espinhal, mas ao contrário apresentavam-se distribuídas por várias direções.

O grupo de animais tratados com as células de Schwann em presença do GDNF apresentou quantidade maior de fibras axonais imunorreativas para a substância P, o que está de acordo com relatos prévios que apontam para o efeito regenerativo deste fator

neurotrófico sobre os neurônios sensitivos (RAMER *et al.*, 2000). Por outro lado, as fibras imunorreativas para a CGRP não mostraram diferenças estatísticas entre os três grupos estudados. Estes achados sugerem que estas duas populações de neurônios sensitivos podem depender de diferentes suportes tróficos para sua sobrevivência. Há de se destacar que estes dois neurotransmissores coexistem parcialmente em neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal, e ainda que, populações de neurônios da medula espinhal expressam diferencialmente estes dois neurotransmissores (interneurônios contendo substância P e motoneurônios periféricos CGRP), e que neurônios supraespinhais com projeções descendentes expressam substância P (SCHAIBLE *et al.*, 1992; CASSAM *et al.*, 1999; SEYBOLD *et al.*, 2003). Em conjunto pode-se especular que neurônios produtores de substância P, independente de suas localizações, parecem projetar fibras com maior facilidade para o interior do enxerto dependendo do estímulo trófico fornecido. Por outro lado, analisando o crescimento comparativo de fibras substância P e CGRP, desta vez no sentido da periferia, autores constataram um crescimento maior de fibras CGRP em relação às fibras substância P (MCLACHLAN *et al.*, 1994), o que pode estar relacionado, entre outras, à natureza da resposta, por neurônios tipo específico, e ao suporte trófico oferecido pela periferia.

De fato, existem relatos sugerindo que o aumento da expressão da substância P na medula espinhal não se deva unicamente às fibras aferentes primárias que entram na medula na altura da lesão. A expressão aumentada resultaria também do crescimento de processos de interneurônios espinais e ou aumento da expressão gênica destes neurônios (CASSAM *et al.*, 1999). Em contrapartida a produção e liberação do CGRP ocorreriam de forma mais exclusiva a partir de fibras aferentes primárias em resposta a estímulos nocivos (MORTON & HUTCHISON, 1989; CASSAM *et al.*, 1999). Deste modo, esta resposta

regenerativa diferencial tipo específico de fibras pode ser a responsável pela diferença na quantidade de fibras substância P entre os grupos, enquanto não se observou diferença entre as fibras CGRP positivas. Em acréscimo a isto, é conhecido o fato da competição entre CGRP e substância P no catabolismo por endopeptidases, resultando em concentrações extracelulares prolongadas de substância P após a liberação dos peptídeos a partir dos neurônios aferentes primários. Desta forma, concentrações de CGRP que não têm efeito por si só sobre os neurônios medulares *in vivo* vão facilitar as ações da substância P (SEYBOLD *et al.*, 2003).

Os diferentes graus de recuperação funcional observados nos animais estudados se correlacionaram de forma direta com o número de fibras imunorreativas encontradas no epicentro do enxerto. Postula-se que a regeneração de uma pequena quantidade dos axônios descendentes é suficiente para guiar os circuitos segmentares envolvidos na geração dos padrões básicos de locomoção e diminuir a deficiência funcional observada após a lesão medular (BLIGHT, 1983; HELGREN & GOLDBERGER, 1993; FEHLINGS & TATOR, 1995; BASSO *et al.*, 1996; RIBOTTA *et al.*, 2000).

Deve ser ressaltado que as fibras que regeneraram no interior do enxerto de células, inclusive nos grupos tratados com o GDNF não cresceram de modo substancial em direção aos segmentos preservados da medula espinhal, como indicado pela ausência de fibras serotoninérgicas (5-HT) positivas na medula lombar dos animais tratados. Surpreendente que, a despeito da ausência de crescimento de fibras regeneradas a partir do enxerto, os animais tratados com células, particularmente em presença do GDNF, apresentaram melhor performance do comportamento motor.

Deve-se considerar, ainda, o efeito da plasticidade neuronal e glial, na medula espinhal sobre a recuperação funcional, demonstrado neste estudo pela análise da

imunorreatividade da MAP-2 nos segmentos distais das medulas espinhais dos animais transplantados. Sabe-se que as alterações adaptativas, atividade dependentes, na circuitaria e na transmissão sináptica dos neurônios ocorrem após uma lesão, podendo resultar em alterações funcionais duradouras na rede neuronal (MÜLLER, 1993). Deste modo, a regeneração do SNC maduro pode se beneficiar da recapitulação dos processos do desenvolvimento, compensando as perdas funcionais subsequentes à lesão. Este processo inclui a elaboração de vias de projeção, à distância, e da circuitaria próxima ao local da lesão. Primeiramente, ocorre uma fase atividade dependente, em que conexões se agrupam aleatoriamente e, a seguir, uma fase de refinamento, também atividade dependente, em que apenas as conexões com efetividade funcional são preservadas. Esta efetividade é determinada pelo sucesso na ativação de alvos pós sinápticos. Além disso, vias ao se tornarem efetivas podem aumentar o seu número local de sinapses bem como a eficácia delas (STENT, 1973). Deste modo, os achados relativos à imunorreatividade da MAP-2 nos seguimentos distais das medulas espinhais dos grupos de animais estudados mostram modificações na circuitaria local que podem constituir o substrato anatômico responsável pela melhora nos parâmetros motores observada nos animais estudados.

Os mecanismos moleculares relacionados à interação neurono-glia e o porquê da heterogeneidade regional das células gliais ainda são pouco conhecidos, existindo, no entanto, várias evidências que apontam para as células da glia, especialmente os astrócitos, como tendo um papel importante no estabelecimento da conectividade axonal (MÜLLER, 1993). Após a lesão do SNC, os astrócitos são importantes na eliminação de conexões aberrantes e na proliferação e estabilização de conexões corretas (CONRADI & RONNEVI, 1975). Além disso, os astrócitos são importantes no processo de tamponamento iônico de potássio e cálcio, com conseqüente reflexo sobre a excitabilidade

neuronal, sendo demonstrado também que estas células podem modular diretamente a atividade neuronal pela secreção de substâncias neuroativas (NEWMAN, 2003). Estudos com co-cultura de células gliais e neurônios bem como estudos com preparação tecidual demonstram a capacidade das células gliais ativadas de despolarizar neurônios e modular a liberação de substâncias a partir dos terminais pré-sinápticos (ARAQUE *et al.*, 1998; CASTONGUAY & ROBITAILLE, 2001).

Estes achados sugerem que a relação que existe entre astrócitos e neurônios pode determinar modificações na excitabilidade neuronal como uma tentativa de compensação de uma perda funcional. Estas modificações, que podem determinar uma sensibilidade maior da medula espinhal lesada ao tratamento, associadas a estímulos adequados, como a presença de fatores neurotróficos e determinadas populações celulares (ex: células de Schwann) podem constituir o substrato adequado para abrir o terreno para a possível ação de fibras regeneradas que venham a ultrapassar a borda da lesão e atingir o tecido normal. Deste modo, é possível que as fibras que cresceram pelo enxerto colocado na medula espinhal do presente modelo, mesmo que em número reduzido, podem ter promovido alguma excitabilidade nas bordas da lesão, de forma a estimular interneurônios da medula espinhal a ponto de influenciar neurofuncionalmente os animais tratados.

Sendo assim, as respostas de ativação astrocitária em toda a medula espinhal lesada, como descrito neste trabalho após uma lesão parcial em um segmento do órgão, e o crescimento de fibras observado após os enxertos de células nas transecções totais, podem, juntas, ter contribuído para a melhora funcional constatada. Esta análise torna-se importante em vista do fato de, até o presente momento, o crescimento de fibras regeneradas ocorrer através do tecido medular cranial e caudal adjacentes à lesão na extensão de alguns segmentos medulares apenas (BUNGE, 2001; BAMBER *et al.*, 2001).

Os achados deste trabalho mostram o crescimento de fibras nervosas para o interior de enxertos de células de Schwann associado às respostas neuroplásticas do tecido não lesado, e que a manipulação do sistema através da administração de fatores neurotróficos pode aumentar o número de fibras regeneradas além dos benefícios comportamentais. Modificação genética das populações de células enxertadas, a associação de fatores neurotróficos, a análise da interação das fibras em crescimento com o microambiente regenerativo e a promoção da neuroplasticidade poderão favorecer a regeneração medular com reflexos na recuperação funcional.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A – Enxertos de células de Schwann colocados na solução de continuidade feita pela transecção total da medula espinhal de ratos ao nível torácico baixo promoveu a recuperação parcial do comportamento motor e da atividade motora em membros posteriores, um efeito potenciado pela presença do GDNF no enxerto.

B – Tal enxerto promoveu o aparecimento de número aumentado de fibras marcadas pela imunorreatividade do neurofilamento, GAP-43, MAP-2, efeito potenciado na presença do GDNF no enxerto.

C – O enxerto de células de Schwann promoveu ainda o aparecimento de número aumentado de fibras imunorreativas à substância P mas não ao CGRP, efeito potenciado pelo GDNF no enxerto.

D – Fibras serotoninérgicas descendentes não foram encontradas nos segmentos das medulas espinhais caudais aos enxertos.

E – Os enxertos de células de Schwann promoveram o aparecimento de número maior de fibras MAP-2 imunorreativas nas porções da medula espinhal caudais aos enxertos, efeito potenciado pelo GDNF.

F – A presença de fibras nervosas regeneradas no interior dos enxertos, mesmo que em quantidade limitada e mesmo que não tenham crescido por longas distâncias no tecido medular adjacente à lesão em associação às respostas neuroplásticas do órgão, foram suficientes para a promoção de diferenças no comportamento motor entre os grupos de animais.

G – A transecção parcial da medula espinhal promoveu a reatividade das células gliais astrócito e microglia em áreas bilaterais da substância branca e cinza de níveis medulares adjacentes e distantes da lesão, indicando a possibilidade de efeitos tróficos e

plásticos em toda a medula espinhal, efeito que também pode ter corroborado à melhora funcional observada após a colocação dos enxertos com células nos animais submetidos à transecção medular total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AEBISCHER, P.; WINN, S. R.; TRESCO, P. A.; JAEGER, C. B.; GREENE, L. A. Transplantation of polymer encapsulated neurotransmitter secreting cells: effect of the encapsulation technique. *J Biomech Eng*, **v.113**, p.178-83, 1991.
- AGUAYO, A. J.; DAVID, S.; BRAY, G. M. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol*, **v.95**, p.231-40, 1981.
- ANDERSON, K. D.; PANAYOTATOS, N.; CORCORAN, T. L.; LINDSAY, R. M.; WIEGAND, S. J. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **v.93**, p.7346-51, 1996.
- ARAQUE, A.; SANZGIRI, R. P.; PARPURA, V.; HAYDON, P. G. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, **v.18**, p.6822-9, 1998.
- BAMBER, N. I.; LI, H.; LU, X.; OUDEGA, M.; AEBISCHER, P.; XU, X. M. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels. *Eur J Neurosci*, **v.13**, p.257-68, 2001.
- BARRET, C. P.; DONATI, E. J.; GUTH, L. Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp Neurol*, **v.84**, p.374-85, 1984.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, **v.139**, p.244-56, 1996.
- BLAKEMORE, W. F. Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted from the sciatic nerve. *Nature*, **v.266**, p.68-9, 1977.

* ABNT NBR 6023. RJ: ABNT, 2000. 22p.

- BLESCH, A.; TUSZYNSKI, M. H. GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection. *J Comp Neurol*, **v.436**, p.399-410, 2001.
- BLIGHT, A. R. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*, **v.10**, p.521-43, 1983.
- BREGMAN, B. S.; MCATEE, M.; DAI, H. N.; KUHN, P. L. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol*, **v.148**, p.475-94, 1997.
- BREGMAN, B. S. Regeneration in the spinal cord. *Curr Opin Neurobiol*, **v.8**, p.800-7, 1998.
- BUJ-BELLO, A.; BUCHMAN, V. L.; HORTON, A.; ROSENTHAL, A.; DAVIES, A. M. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*, **v.19**, p.821-8, 1995.
- BUNGE, M. B. Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist*, **v.7**, p.325-39, 2001.
- CASELLA, G. T. B.; BUNGE, R. P.; WOOD, P. M. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia*, **v.17**, p.327-38, 1996.
- CASSAM, A. K.; ROGERS, K. A.; WEAVER, L. C. Co-localization of substance P and dopamine beta-hydroxylase with growth-associated protein-43 is lost caudal to a spinal cord transection. *Neuroscience*, **v.88**, p.1275-88, 1999.
- CASTONGUAY, A.; LEVESQUE, S.; ROBITAILLE, R. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res*, **v.132**, p.227-40, 2001.

- CHADI, G.; MOLLER, A.; ROSEN, L.; JANSON, A. M.; AGNATI, L. A.; GOLDSTEIN, M.; et al. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*, **v.97**, p.145-58, 1993a.
- CHADI, G.; ROSEN, L.; CINTRA, A.; TINNER, B.; ZOLI, M.; PETTERSSON, R. F.; et al. Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport*, **v.4**, p.783-6, 1993b.
- CHADI, G.; TINNER, B.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) immunoreactivity exists in the noradrenaline, adrenaline and 5HT nerve cells of the rat brain. *Neurosci Lett*, **v.160**, p.171-6, 1993c.
- CHADI, G.; CAO, Y.; PETTERSSON, R. F.; FUXE, K. Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. *Neuroscience*, **v.61**, p.891-910, 1994.
- CHADI, G.; ANDRADE, M. S.; LEME, R. J.; GOMIDE, V. C. Experimental models of partial lesion of rat spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int J Neurosci*, **v.111**, p.137-65, 2001.
- CHENG, H.; CAO, Y.; OLSON, L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*, **v.273**, p.510-3, 1996.
- CHENG, H.; FRAIDAKIS, M.; BLOMBACK, B.; LAPCHAK, P.; HOFFER, B.; OLSON, L. Characterization of a fibrin glue-GDNF slow-release preparation. *Cell Transplant*, **v.7**, p.53-61, 1998.
- CHENG, H.; WU, J. P.; TZENG, S. F. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. *J Neurosci Res*, **v.69**, p.397-405, 2002.

- CONRADI, S.; RONNEVI, L. O. Spontaneous elimination of synapses on cat spinal motoneurons after birth: do half of the synapses on the cell bodies disappear? *Brain Res*, **v.92**, p.505-10, 1975.
- DAVIES, S. J.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol*, **v.142**, p.203-16, 1996.
- DE OLIVEIRA, A. R.; CASTRUCCI, A. M.; VISCONTI, M. A. Cellular signalling in vertebrate pigment cells. *Braz J Med Biol Res*, **v.29**, p.1743-9, 1996.
- DEZAWA, M. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat Sci Int*, **v.77**, p.12-25, 2002.
- DIENER, P. S.; BREGMAN, B. S. Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci*, **v.18**, p.779-93, 1998a.
- DIENER, P. S.; BREGMAN B. S. Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci*, **v.18**, p.763-78, 1998b.
- DIETRICH W.D. Research reviews - The Stem Cell: Another Promising Tool – 2001. Disponível em: <www.miamiproject.miami.edu>. Acesso em 17/10/2003.
- DONG, Z.; DEAN, C.; WALTERS, J. E.; MIRSKY, R.; JESSEN K. R. Response of Schwann Cells to Mitogens In Vitro Is Determined by Pre-exposure to Serum, Time In Vitro and Developmental Age. *Glia*, **v.20**, p.219-30, 1997.
- DOU, C. L.; LEVINE J. M. Identification of a neuronal cell surface receptor for a growth inhibitory chondroitin sulfate proteoglycan (NG2). *J Neurochem*, **v.68**, p.1021-30, 1997.

- DOUGHERTY, K. D.; DREYFUS, C. F.; BLACK, I. B. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, **v.7**, p.574-85, 2000.
- EDGERTON, V. R.; DE LEON, R. D.; TILLAKARATNE, N.; RECKTENWALD, M.R.; HODGSON, J. A.; ROY, R. R. Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing. *Adv Neurol*, **v.72**, p.233-47, 1997.
- ELDE, R.; CAO, Y. H.; CINTRA, A.; BRELJE, T. C.; PELTO-HUIKKO, M.; JUNTILA, T.; et al. Prominent expression of acidic fibroblast growth factor in motor and sensory neurons. *Neuron*, **v.7**, p.349-64, 1991.
- ELKABES, S.; DICICCO-BLOOM, E. M.; BLACK, I. B. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*, **v.16**, p.2508-21, 1996.
- FAWCETT, J. W. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res*, **v.290**, p.371-7, 1997.
- FAWCETT, J. W. Spinal cord repair: from experimental models to human application. *Spinal Cord*, **v.36**, p.811-7, 1998.
- FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, **v.49**, p.377-91, 1999.
- FEHLINGS, M. G.; TATOR, C. H. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, **v.132**, p.220-8, 1995.
- FLORENCE, S. L.; KAAS, J. H. Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in monkeys. *J Neurosci*, **v.19**, p.8083-95, 1995.

- FRAUTSCHY, S. A.; WALICKE, P. A.; BAIRD, A. Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury. *Brain Res*, **v.553**, p.291-9, 1991.
- FRIEDMAN, J. A.; WINDEBANK, A. J.; MOORE, M. J.; SPINNER, R. J.; CURRIER, B. L.; YASZEMSKI, M. J. Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery*, **v.51**, p.742-51, 2002.
- GALE, K.; KERASIDIS, H.; WRATHALL, J. R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol*, **v.88**, p.123-34, 1985.
- GAVIRIA, M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P.; KAMENKA, J.; HATON, H.; OHANNA, F. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res*, **v.874**, p.200-9, 2000.
- GIROUX, N.; CHAU, C.; BARBEAU, H.; READER, T. A.; ROSSIGNOL, S. Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion. II. NMDA and AP-5 in intact and late spinal cats. *J Neurophysiol*, **v.90**, p.1027-45, 2003.
- GIULIAN, D.; VACA, K.; CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci*, **v.13**, p.29-37, 1993.
- GOLDBERGER, M. E. Spared-root deafferentation of a cat's hindlimb: hierarchical regulation of pathways mediating recovery of motor behavior. *Exp Brain Res*, **v.73**, p.329-42, 1988.
- GOMEZ-PINILLA, F.; LEE, J. W.; COTMAN, C. W. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J Neurosci*, **v.12**, p.345-55, 1992.

- GOMIDE, V. C.; CHADI, G. The trophic factor S-100b and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. *Brain Res*, **v.835**, p.162-74, 1999.
- GONZALEZ, A. M.; BUSCAGLIA, M.; ONG, M.; BAIRD, A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol*, **v.110**, p.753-65, 1990.
- GRILL, R. J.; BLESCH, A.; TUSZYNSKI, M. H. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol*, **v.148**, p.444-52, 1997.
- GUENARD, V.; KLEITMAN, N.; MORRISSEY, T. K.; BUNGE, R. P.; AEBISCHER, P. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*, **v.12**, p.3310-20, 1992.
- GUEST, J. D.; RAO, A.; OLSON, L.; BUNGE, M. B.; BUNGE R. P. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurol*, **v.148**, p.502-22, 1997.
- GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, **v.96**, p.379-94, 1988.
- GURGO, R. D.; BEDI, K. S.; NURCOMBE, V. Current concepts in central nervous system regeneration. *J Clin Neurosci*, **v.9**, p.613-7, 2002.
- HAMBURGER, V. The history of the placaverty of the nerve growth factor. *J Neurobiol*, **v.24**, p.893-7, 1993.

- HASE, A.; SUZUKI, H.; ARAHATA, K.; AKAZAWA, C. Expression of human GFR alpha-1 (GDNF receptor) at the neuromuscular junction and myelinated nerves. *Neurosci Lett*, **v.269**, p.55-7, 1999.
- HELGREN, M. E.; GOLDBERGER, M. E. The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp Neurol*, **v.123**, p.17-34, 1993.
- HENDERSON, C. E.; PHILLIPS, H. S.; POLLOCK, R. A.; DAVIES, A. M.; LEMEULLE, C.; ARMANINI, M.; et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, **v.266**, p.1062-4, 1994.
- HEUMANN, R.; KORSCHING, S.; BANDTLOW, C.; THOENEN, H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol*, **v.104**, p.1623-31, 1987.
- HÖKE, A.; GORDON, T.; ZOCHODNE, D. W.; SULAIMAN, O. A. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol*, **v.173**, p.77-85, 2002.
- HÖKE, A.; HO, T.; CRAWFORD, T. O.; LEBEL, C.; HILT, D.; GRIFFIN, J. W. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci*, **v.23**, p.561-7, 2003.
- HONMOU, O.; FELTS, P. A.; WAXMAN, S. G.; KOCSIS, J. D. Restoration of normal conduction properties in demyelinated spinal cord axons in the adult rat by transplantation of exogenous Schwann cells. *J Neurosci*, **v.16**, p.3199-208, 1996.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, **v.75**, p.816-21, 1981.

- HUMPEL, C.; CHADI, G.; LIPPOLDT, A.; GANTEN, D.; FUXE, K.; OLSON, L. Increase of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) messenger RNA and protein following implantation of a microdialysis probe into rat hippocampus. *Exp Brain Res*, **v.98**, p.229-37, 1994.
- IGARASHI, Y.; UTSUMI, H.; CHIBA, H.; YAMADA-SASAMORI, Y.; TOBIOKA, H.; KAMIMURA, Y.; et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Com*, **v.261**, p.108-12, 1999.
- JAKEMAN, L. B.; WEI, P.; GUAN, Z.; STOKES, B. T. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol*, **v.194**, p.170-84, 1998.
- JIRSOVÁ, K.; SODAAR, P.; MANDYS, V.; BAR, P. R. Cold jet: a method to obtain pure Schwann cell cultures without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment. *J Neurosci Methods*, **v.78**, p.133-7, 1997.
- KANJE, M.; SKOTTNER, A.; SJOBERG, J.; LUNDBORG, G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res*, **v.486**, p.396-8, 1989.
- KEILHOFF, G.; FANSA, H.; SCHNEIDER, W.; WOLF, G. In Vivo Predegeneration of Peripheral Nerves: An Effective Technique to Obtain Activated Schwann Cells for Nerve Conduits. *J Neurosci Methods*, **v.89**, p.17-24, 1999.
- KOHAMA, I.; LANKFORD, K. L.; PREININGEROVA, J.; WHITE, F. A.; VOLLMER, T. L.; KOCSIS, J. D. Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord. *J Neurosci*, **v.21**, p.944-50, 2001.

- KOSHINAGA, M.; WHITTEMORE S. R. The temporal and spatial activation of microglia fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J Neurotrauma*, **v.12**, p.209-22, 1995.
- KROMER, L. F.; CORNBROOKS, C. J. Transplants of Schwann cell cultures promote axonal regeneration in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **v.82**, p.6330-4, 1985.
- KWON, B. K.; OXLAND, T. R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, **v.27**, p.1904-10, 2002.
- LEME, R. J. A.; CHADI, G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. *Arq Neuropsiq*, **v.59**, p.483-492, 2001.
- LEVI, A. D. Characterization of the technique involved in isolating Schwann cells from adult human peripheral nerve. *J Neurosci Methods*, **v.68**, p.21-6, 1996.
- LI, R. Culture Methods for Selective Growth of normal Rat and Human Schwann Cells. *Methods Cell Biol*, **v.57**, p.167-86, 1998.
- LI, Y.; RAISMAN, G. Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, **v.14**, p.4050-63, 1994.
- LI, R. H.; SLIWKOWSKI, M. X.; LO, J.; MATHER, J. P. Establishment of Schwann cell lines from normal adult and embryonic rat dorsal root ganglia. *J Neurosci Methods*, **v.67**, p.57-69, 1996.
- LIN, L. F.; DOHERTY D. H.; LILE, J. D.; BEKTESH, S.; COLLINS, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, **v.260**, p.1130-2, 1993

- LIU, S.; QU, Y.; STEWART, T. J.; HOWARD, M. J.; CHAKRABORTTY, S.; HOLEKAMP, T. F.; et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **v.97**, p.6126-6131, 2000.
- LIU, Y.; HIMES, B. T.; MURRAY, M.; TESSLER, A.; FISCHER, I. Grafts of BDNF-producing fibroblasts rescue axotomized rubrospinal neurons and prevent their atrophy. *Exp Neurol*, **v.178**, p.150-64, 2002.
- LU, K. W.; CHEN, Z. Y.; JIN, D. D.; HOU, T. S.; CAO, L.; FU, Q. Cationic liposome-mediated GDNF gene transfer after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **v.19**, p.1081-90, 2002.
- MCDONALD, J. W.; LIU, X. Z.; QU, Y.; LIU, S.; MICKEY, S. K.; TURETSKY, D.; et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*, **v.5**, p.1410-2, 1999.
- MCKEON, R. J.; SCHREIBER, R. C.; RUDGE, J. S.; SILVER, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*, **v.11**, p.3398-411, 1991.
- MCLACHLAN, E. M.; KEAST, J. R.; BAUER, M. SP- and CGRP-immunoreactive axons differ in their ability to reinnervate the skin of the rat tail. *Neurosci Lett*, **v.176**, p.147-51, 1994.
- MARTIN, D.; SCHOENEN, J.; DELREE, P.; RIGO, J. M.; REGISTER, B.; LEPRINCE, P.; et al. Syngeneic grafting of adult rat DRG-derived Schwann cells to the injured spinal cord. *Brain Res Bull*, **v.30**, p.507-14, 1993.

- MARTIN, D.; ROBE, P.; FRANZEN, R.; DELREE, P.; SCHOENEN, J.; STEVENAERT, A.; et al. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J Neurosci Res*, **v.45**, p.588-97, 1996.
- MATSUYAMA, A.; IWATA, H.; OKUMURA, N.; YOSHIDA, S.; IMAIZUMI, K.; LEE, Y.; et al. Localization of basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*, **v.587**, p.49-65, 1992.
- MENEI, P.; MONTERO-MENEI, C.; WHITTEMORE, S. R.; BUNGE R. P.; BUNGE, M. B. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, **v.10**, p.607-21, 1998.
- MONTERO-MENEI, C. N.; POUPLARD-BARTHELAIX, A.; GUMPEL, M.; BARON-VAN EVERCOOREN, A. Pure Schwann cell suspension grafts promote regeneration of the lesioned septo-hippocampal cholinergic pathway. *Brain Res*, **v.570**, p.198-208, 1992.
- MOONEN, G.; ROGISTER, B.; LEPRINCE, P.; RIGO, J. M.; DELREE, P.; LEFEBVRE, P. P.; et al. Neurono-glial interactions and neural plasticity. *Prog Brain Res*, **v.86**, p.63-73, 1990.
- MOORE, M. W.; KLEIN, R. D.; FARINAS, I.; SAUER, H.; ARMANINI, M.; PHILLIPS, H.; et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, **v.382**, p.76-9, 1996.
- MORRISSEY, T. K.; KLEITMAN, N.; BUNGE, R. P. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci*, **v.11**, p.2433-42, 1991.
- MORTON, C. R.; HUTCHISON, W. D. Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin. *Neuroscience*, **v.31**, p.807-19, 1989.

- MUKHOPADHYAY, G.; DOHERTY, P.; WALSH, F. S.; CROCKER, P. R.; FILBIN, M. T. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, **v.13**, p.757-67, 1994.
- MULLER, C. M. Glial cell functions and activity-dependent plasticity of the mammalian visual cortex. *Perspect Dev Neurobiol*, **v.1**, p.169-77, 1993.
- MULTON, S.; FRANZEN, R.; POIRRIER, A. L.; SCHOLTES, F.; SCHOENEN, J. The effect of treadmill training on motor recovery after a partial spinal cord compression-injury in the adult rat. *J Neurotrauma*, **v.20**, p.699-706, 2003.
- MURRAY, M. Strategies and mechanisms of recovery after spinal cord injury. *Adv Neurol*, **v.72**, p.219-25, 1997.
- NEWMAN, E. A. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci*, **v.23**, p.1659-66, 2003.
- NOVIKOVA, L.; NOVIKOV, L.; KELLERTH, J. O. Effects of neurotransplants and BDNF on the survival and regeneration of injured adult spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*, **v.9**, p.2774-7, 1997.
- OORSCHOT, D. E.; MCLENNAN, I. S. The trophic requirements of mature motoneurons. *Brain Res*, **v.789**, p.319-21, 1998.
- OTTO, D.; FROTSCHER, M.; UNSICKER, K. Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J Neurosci Res*, **v.22**, p.83-91, 1989.
- OTTO, D.; UNSICKER, K. FGF-2 modulates dopamine and dopamine-related striatal transmitter systems in the intact and MPTP-lesioned mouse. *Eur J Neurosci*, **v.5**, p.927-32, 1993.

- PARK, L. C.; ZHANG, H.; GIBSON, G. E. Co-culture with astrocytes or microglia protects metabolically impaired neurons. *Mech Ageing Dev*, **v.123**, p.21-7, 2001.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain: in stereotaxic coordinates. San Diego: Hartcourt Brace Jovanovich, 1986
- PENG, H. B.; YANG, J. F.; DAI, Z.; LEE, C. W.; HUNG, H. W.; FENG, Z. H.; et al. Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J Neurosci*, **v.23**, p.5050-60, 2003.
- PLANT, G. W.; BATES, M. L.; BUNGE, M. B. Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface. *Mol Cell Neurosci*, **v.17**, p.471-87, 2001.
- PRAT, A.; BIERNACKI, K.; WOSIK, K.; ANTEL, J. P. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*, **v.36**, p.145-55, 2001.
- RABCHEVSKY, A. G.; STREIT, W. J. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res*, **v.47**, p.34-48, 1997.
- RAISMAN, G. Use of Schwann cells to induce repair of adult CNS tracts. *Rev Neurol*, **v.193**, p.521-5, 1997.
- RAMER, M. S.; HARPER, G. P.; BRADBURY, E. J. Progress in spinal cord research - a refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord*, **v.38**, p.449-72, 2000.
- RAMER, M. S.; PRIESTLEY, J. V.; MCMAHON, S. B. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature*, **v.403**, p.312-6, 2000.

- RAMÓN-CUETO, A.; PLANT, G. W.; AVILA, J.; BUNGE, M. B. Long-Distance Axonal Regeneration in the Transected Adult Rat Spinal Cord Is Promoted by Olfactory Ensheathing Glia Transplants. *J Neurosci*, **v.18**, p.3803-19, 1998.
- RIBOTTA, M. G.; PROVENCHER, J.; FERABOLI-LOHNHERR, D.; ROSSIGNOL, S.; PRIVAT, A.; ORSAL, D. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci*, **v.20**, p.5144-52, 2000.
- RIETHMACHER, D.; SONNENBERG-RIETHMACHER, E.; BRINKMANN, V.; YAMAAI, T.; LEWIN, G. R.; BIRCHMEIER, C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, **v.389**, p.725-30, 1997.
- RIVA, M. A.; DONATI, E.; TASCEDDA, F.; ZOLLI, M.; RACAGNI, G. Short and long term induction of bFGF gene expression in rat central nervous system following kainate injection. *Neuroscience*, **v.59**, p.55-65, 1994.
- RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord **injury** in the rat. *J Neurosurg*, **v.47**, p.577-81, 1977.
- ROSENBLUTH, J.; SCHIFF, R.; LIANG, W. L.; MENNA, G.; YOUNG, W. Xenotransplantation of transgenic oligodendrocyte-lineage cells into spinal cord-injured adult rats. *Exp Neurol*, **v.147**, p.172-82, 1997.
- RUDGE, J. S.; SILVER, J. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci*, **v.10**, p.3594-603, 1990.
- SAARMA, M.; SARIOLA, H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech*, **v.45**, p.292-302, 1999.
- SAGEN, J. Research reviews - Going Beyond Bridges: A Quest for Reconnection – 2003. Disponível em: <www.miamiproject.miami.edu> Acesso em 17/10/2003.

- SANCHEZ, M. P.; SILOS-SANTIAGO, I.; FRISEN, J.; HE, B.; LIRA, S. A.; BARBACID, M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, **v.382**, p.70-3, 1996.
- SARUHASHI, Y.; YOUNG, W. Effect of mianserin on locomotory function after thoracic spinal cord hemisection in rats. *Exp Neurol*, **v.129**, p.207-16, 1994.
- SATAKE, K.; MATSUYAMA, Y.; KAMIYA, M.; KAWAKAMI, H.; IWATA, H.; ADACHI, K.; et al. Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury. *Neuroreport*, **v.11**, p.3877-81, 2000.
- SCHAIBLE, H. G.; HOPE, P. J.; LANG, C. W.; DUGGAN, A. W. Calcitonin Gene-related Peptide Causes Intraspinal Spreading of Substance P Released by Peripheral Stimulation. *Eur J Neurosci*, **v.4**, p.750-757, 1992.
- SCHWAB, M. E.; KAPFHAMMER, J. P.; BANDTLOW, C. E. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci*, **v.16**, p.565-95, 1993.
- SHAO, Y.; MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. *Glia*, **v.11**, p.147-55, 1994.
- SEYBOLD, V. S.; MCCARSON, K. E.; MERMELSTEIN, P. G.; GROTH, R. D.; ABRAHAM, L. G. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. *J Neurosci*, **v.23**, p.1816-24, 2003.
- SMITH, G. V.; STEVENSON, J. A. Peripheral nerve grafts lacking viable Schwann cells fail to support central nervous system axonal regeneration. *Exp Brain Res*, **v.69**, p.299-306, 1988.
- STAHNISCH, F. W.; NITSCH, R. Santiago Ramon y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends Neurosci*, **v.25**, p.589-91, 2002.

- STANGEL, M.; HARTUNG, H. P. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, **v.68**, p.361-76, 2002.
- STENT, G. S. A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc Natl Acad Sci USA*, **v.70**, p.997-1001, 1973.
- STICHEL, C. C.; LIPS, K.; WUNDERLICH, G.; MULLER, H. W. Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. *Exp Neurol*, **v.140**, p.21-36, 1996.
- TAKAMI, T.; OUDEGA, M.; BATES, M. L.; WOOD, P. M.; KLEITMAN, N.; BUNGE, M. B. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci*, **v.22**, p.6670-81, 2002.
- TUSZYNSKI, M. H.; PETERSON, D. A.; RAY, J.; BAIRD, A.; NAKAHARA, Y.; GAGE, F. H. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Exp Neurol*, **v.126**, p.1-14, 1994.
- TUSZYNSKI, M. H.; GRILL, R.; JONES, L. L.; BRANT, A.; BLESCH, A.; LOW, K.; et al. NT-3 gene delivery elicits growth of chronically injured corticospinal axons and modestly improves functional deficits after chronic scar resection. *Exp Neurol*, **v.181**, p.47-56, 2003.
- VAUDANO, E.; CAMPBELL, G.; ANDERSON, P. N.; DAVIES, A. P.; WOOLHEAD, C.; SCHREYER, D. J.; et al. The effects of a lesion or a peripheral nerve graft on GAP-43 upregulation in the adult rat brain: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Neurosci*, **v.19**, p.3594-611, 1995.

- VAUDANO, E.; CAMPBELL, G.; HUNT, S. P. Change in the molecular phenotype of Schwann cells upon transplantation into the central nervous system: down-regulation of c-jun. *Neuroscience*, **v.74**, p.553-65, 1996.
- WAXMAN, S. G.; UTZSCHNEIDER, D. A.; KOCSIS, J. D. Enhancement of action potential conduction following demyelination: experimental approaches to restoration of function in multiple sclerosis and spinal cord injury. *Prog Brain Res*, **v.100**, p.233-43, 1994.
- WEISS, B.; DEL TURCO, D.; LAYER, P. G. Proliferating and differentiating Schwann cell cultures from embryonic chick sciatic nerve maintained for months in vitro without antimitotics or growth factors. *Eur J Cell Biol*, **v.70**, p.106-16, 1996.
- WIDENFALK, J.; LUNDSTROMER, K.; JUBRAN, M.; BRENE, S.; OLSON, L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci*, **v.21**, p.3457-75, 2001.
- WILBY, M. J.; SINCLAIR, S. R.; MUIR, E. M.; ZIETLOW, R.; ADCOCK, K. H.; HORELLOU, P.; et al. A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra. *J Neurosci*, **v.19**, p.2301-12, 1999.
- WRATHALL, J. R.; RIGAMONTI, D. D.; BRAFORD, M. R.; KAO, C. C. Reconstruction of the contused cat spinal cord by the delayed nerve graft technique and cultured peripheral non-neuronal cells. *Acta Neuropathol*, **v.57**, p.59-69, 1982.
- XU, X. M.; GUENARD, V.; KLEITMAN, N.; BUNGE, M. B. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol*, **v.351**, p.145-60, 1995.

- XU, X. M.; CHEN, A.; GUÉNARD, V.; KLEITMAN, N.; BUNGE, M. B. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol*, **v.26**, p.1-16, 1997.
- YOUNG, W. Spinal cord regeneration. *Science*, **v.273**, p.451, 1996.
- YU, W.; HAO, J. X.; XU, X. J.; HOKFELT, T.; ELDE, R.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Spinal cord ischemia reduces mu-opioid receptors in rats: correlation with morphine insensitivity. *Neuroreport*, **v.10**, p.87-91, 1999.
- ZACHARY, J. F.; BASZLER, T. V.; FRENCH, R. A.; KELLEY, K. W. Mouse Moloney leukemia virus infects microglia but not neurons even though it induces motor neuron disease. *Mol Psychiatry*, **v.2**, p.104-106, 1997.
- ZAGER, E. L.; BLACK, P. M. Neural transplantation. *Surg Neurol*, **v.29**, p.350-66, 1988.
- ZOLI, M.; AGNATI, L. F.; FUXE, K.; FERRAGUTI, F.; BIAGINI, G.; CINTRA, A.; et al. Long-lasting reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal field CA1 but not in the dentate gyrus after neonatal treatment with corticosterone in the rat. *Acta Physiol Scand*, **v.138**, p.577-9, 1990.